

Signaltransduktion von CD97 in humanen Fibrosarkomzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von Susann Brosig

Geburtsdatum / Geburtsort:

21.06. 1985 / Zwickau

angefertigt an der Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Department für
Operative Medizin

Forschungslaboratorien der Chirurgischen Kliniken I und II

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Gabriela Aust

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.03.15

Inhaltsverzeichnis

Bibliografische Beschreibung	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1. Einleitung und Aufgabenstellung	5
1.1. Einleitung	5
1.1.1. Adhäsions-GPCR	5
1.1.2. CD97	5
1.1.3. Die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080	9
1.1.4. Regulation der Kinaseaktivität durch Proteinphosphorylierung	10
1.1.5. Zellmigration	10
1.1.6. Apoptose, Proliferation und Zellzyklus	11
1.2. Aufgabenstellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.2. Methoden	21
2.2.1. Generierung der HT1080 Klone	21
2.2.2. Präparation der Zellen für das Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™)	22
2.2.3. Präparation der Zellen für Western Blot	22
2.2.4. Western Blot	23
2.2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse im Western Blot	23
2.2.6. 2D-Einzelzellmigration	24
2.2.7. Einzelzellmigration unter dem Einfluss von Inhibitoren	25
2.2.8. Signifikanzprüfung des Migrationskoeffizienten	25
2.2.9. Wundverschluss in HT1080	25
2.2.10. Wundverschluss unter dem Einfluss von Inhibitoren	26
3. Ergebnisse	27
3.1. CD97 reguliert die Phosphorylierung zahlreicher Proteine: Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™)	27
3.2. CD97 Überexpression beeinflusst Signalwege in HT1080 Zellen - Verifizierung der Kinexus Daten	31
3.3. CD97 reguliert 2D-Migration	43
3.3.1. CD97 steigert 2D-Einzelzellmigration	43
3.3.2. CD97 reguliert den Wundverschluss	44

4. Diskussion	49
Teil A: Methodendiskussion	49
Teil B: Ergebnisdiskussion	52
4.1. CD97 reguliert Effektorproteine in HT1080	52
4.1.1. CD97 reguliert Signalwege der Zellmigration	52
4.1.1.1. CD97-Überexpression steigert die Phosphorylierungen zahlreicher Effektorproteine des PI3Kinase/Akt-Signalweges und aktiviert Akt-Expression	52
4.1.1.2. CD97 inhibiert Src durch Phosphorylierung von Tyr ⁵²⁹	56
4.1.1.3. CD97 reguliert den Cofilin-Signalweg	58
4.1.1.4. PKC Isoformen werden durch CD97 beeinflusst	60
4.1.2. Apoptose-regulierende Signalproteine	61
4.1.2.1. CD97 Überexpression reduziert Erk-Signalweg-Aktivierung	61
4.1.2.2. PKR1 und c-Jun werden durch CD97-Überexpression reguliert	64
4.1.3. CD97 reguliert Effektorproteine des mTOR-Signalweges - ein Hinweis auf gesteigerte Proliferation?	66
4.1.4. CD97 reguliert Proteine des Zellzyklus	67
4.1.5. Der Einfluss von CD97 auf SMAD	68
4.1.6. Proteine mit fehlender Phosphorylierung in den HT1080 Zellen	69
4.2. CD97 steigert Migration in HT1080 durch Aktivierung des PI3Kinase/Akt-Signalweges und Inhibierung von Src	69
4.2.1. Überexpression von CD97 steigert Migration in HT1080	69
4.2.2. Spezifische Inhibitoren für Src und den PI3Kinase/Akt-Signalweg beeinflussen die CD97-induzierte Migration	70
4.2.3. ROCK und MLCK sind in CD97-induzierte Migrationssteigerung involviert	74
4.3. Werden Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose in HT1080 durch CD97 beeinflusst?	76
4.4. CD97/TM2 wirkt als Kompetitor des endogenen CD97	76
Zusammenfassung	78
Literaturverzeichnis	81
Anlagen	89
Selbständigkeitserklärung, Lebenslauf, Publikation, Danksagung	97

Bibliographische Beschreibung

Brosig, Susann

Signaltransduktion von CD97 in humanen Fibrosarkomzellen

Universität Leipzig, Dissertation

101 Seiten, 125 Literaturangaben, 40 Abbildungen, 13 Tabellen, 4 Anlagen

Referat

CD97 gehört zur Familie der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (aGPCR), die aus einem langen extrazellulären N-terminalen Fragment (NTF) und einem nicht-kovalent gekoppelten C-terminalen Fragment (CTF) mit der sieben-transmembranären (TM7) Region und dem intrazellulären Teil bestehen. CD97 wird in malignen Tumoren exprimiert. In der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 steigert die stabile Überexpression von CD97 die ungerichtete zweidimensionale (2D) Migration einzelner Zellen. Eine Verkürzung von CD97 im CTF auf zwei transmembranäre (TM2) Domänen führt zu einer Suppression der 2D-Migration im Vergleich zu stabil mock-transfektierten HT1080 Kontrollzellen. Wahrscheinlich supprimiert CD97/TM2 die endogene CD97-Wirkung. Unbekannt ist, welche Signalwege durch CD97-Überexpression in HT1080 reguliert werden und welche Signalwege für die Migrationssteigerung von HT1080 verantwortlich sind. Die Klärung dieser Signalwege ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Die Phosphorylierung von Proteinkinasen ist eine posttranslationale Modifikation zur Regulation der Kinaseaktivität mit nachfolgender Aktivierung oder Inaktivierung eines Signalweges. Daher sind Expression und Phosphorylierung der Proteinkinasen zur Identifikation regulierter Signalwege interessant. Dazu wurden in Lysaten von CD97/TM7, CD97/TM2 und mock-transfektierten HT1080 mittels Kineteworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™) 37 verschiedene Proteinphosphorylierungen untersucht und regulierte Signalwege identifiziert. An 25 Phosphorylierungsstellen erfolgt eine Regulation durch CD97. Anschließend wurden die Ergebnisse der interessantesten Proteine hinsichtlich ihrer Expression und Phosphorylierung im Western Blot verifiziert und um Proteine erweitert, die klassisch an der Regulation der Zellmigration beteiligt sind. Es zeigt sich eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges und eine Inhibierung von Src durch CD97. 2D-Migrationsversuche von HT1080 CD97/TM7, CD97/TM2 und mock mit spezifischen Inhibitoren gegen den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und gegen Src bestätigen, dass diese Kinasen an der CD97-induzierten Steigerung der 2D-Migration beteiligt sind. Weiterhin finden sich Hinweise, dass in HT1080 CD97 die Apoptose hemmt und die Proliferation reguliert. Insgesamt wird in dieser Arbeit ein Überblick über die durch CD97 regulierten Signalwege gegeben. Die CD97-gesteigerte 2D-Migration von HT1080 wird durch eine Aktivierung des PI3-Kinase/ Akt-Signalweges und Inhibierung von Src vermittelt.

Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden aus Gründen der Übersicht nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgelistet. Sie sind in Tab. 2.1.6 und Tab. 3.1 mit ihrem Namen und der Abkürzung aufgeführt.

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
5'UTR	5'-untranslatierter Bereich, Leader-RNA
Abb.	Abbildung
aGPCR	Adhäsions-G-Protein gekoppelte Rezeptoren
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungsgruppen (<i>cluster of differentiation</i>)
Cdc25	Cell division cycle 25
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDK	Cycklin-abhängige Kinase
cDNA	komplemetäre DNA
c-fos-Promotor	Proto-Onkogen
cpm	Zählpulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTF	C-terminales Fragment
D	Migrationskoeffizient
DAG	Diacylglycerol
de novo	von Neuem
DIVAA	direkter in vivo Angiogeneseassay (<i>Directed in vivo Angiogenesis Assay</i>)
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F-1	E2F Transkriptionsfaktor 1
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	<i>enhanced</i> Grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ER	Endoplasmatischen Retikulum
et al.	und andere
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAIN	GPCR-Autoproteolyse-induzierend (<i>GPCR-autoproteolysis inducing</i>)
GFP	Grün Fluoreszierende Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
G-Phase	Prämitose- oder Postmitosephase (<i>Gap-Phase</i>)
GPS	GPCR-Proteolytische-Region
GTP	Guanosintriphosphat

in vitro	im Glas
in vivo	im Lebendigen
IP3	Inositol (1,3,4)-trisphosphat
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidsäure
LPAR1	Lysophosphatidic Acid Receptor 1
M	molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEF	embryonale Mausfibroblasten
MEK3/6	Mitogen-activated protein kinase kinase 3 and 6
min	Minuten
MLC2	Myosin-light-chain 2
MLCK	Myosin-light-chain-Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
M-Per	Mammalian Protein Extraction Reagent
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
mTOR	mammalian (mechanistic) Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl
NIH/3T3	Fibroblastenzelllinie
NR1	N-methyl-D-aspartate glutamate receptor 1 subunit
NTF	N-terminales Fragment
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38 alpha MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
p53	Tumor Protein p53, Tumorsuppressor Protein
Pak	p21cdc42/rac1-activated serine/threonine kinase
pBI	Bidirektionaler Promotor (<i>Bidirectional Promoter Vector</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKC	Proteinkinase C
Plk1	Polo-like kinase 1
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Poncau S	3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-2,7-naphthalindisulfonsäure Tetranatriumsalz
PP	Polypropylen
PP1	Proteinphosphatase 1
pWE-4	Promoter für in vitro Transkription, enthält einen Hygromycin-Resistenz-Marker
Pyp3	Protein-Tyrosin Phosphatase 3
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
Rho-GTPase	Ras-homologe GTPase
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase
RSK 1/3	Ribosomale Protein S6 Kinase 1
s	siehe
S6 Kinase	Protein S6 Kinase
scid	schwerer kombinierter Immundefekt (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>Small Cell Lung Cancer</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Fehler der Standardabweichung (<i>standard error of the mean</i>)
Ser	Serin

SGC-7901	Magenkarzinomzelllinie
SH2	Src-homologie 2
S-Phase	Synthese-Phase
SSH1L	Slingshot homolog 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBS/T	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Thr	Threonin
TM	transmembranär
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenol Ethoxylate
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp

1. Einleitung und Aufgabenstellung

1.1. Einleitung

1.1.1. Adhäsions-GPCR

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind eine der größten bekannten Proteinfamilien und steuern zahlreiche zelluläre Funktionen. Die Signaltransduktion der klassischen GPCR erfolgt durch Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen. Ein strukturelles Merkmal dieser Rezeptoren ist der sieben-transmembranäre Abschnitt (TM7), aus dem sich die Bezeichnung TM7-Rezeptoren ableitet. Entsprechend der GRAFS-Klassifikation werden GPCR auf der Grundlage von strukturellen Eigenschaften der TM7-Regionen in folgende fünf Gruppen unterteilt: Glutamat, Rhodopsin, Adhäsion, Frizzled/Taste 2 and Sekretin. Die Rhodopsin-Familie stellt dabei die größte Gruppe dar [1, 2]. Die Adhäsions-GPCR-Familie im Menschen umfasst 33 Rezeptoren. Adhäsions-GPCR (aGPCR) werden auf normalen, aber auch malignen Zellen endodermalen, ektodermalen und mesodermalen Ursprungs exprimiert. Der extrazelluläre Anteil ist in fast allen Adhäsions-GPCR deutlich größer als in den klassischen GPCR. Hier findet sich die große Zahl von verschiedensten Proteindomänen, von denen einige an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion beteiligt sind, auf die sich der Name Adhäsions-GPCR bezieht. Anhand molekularer Charakteristika der TM7-Region und aufgrund von Unterschieden in den Proteindomänen der extrazellulären Region werden die Adhäsions-GPCR neun verschiedenen Familien zugeordnet. Die Adhäsions-GPCR sind heterodimere Membranproteine. Sie bestehen aus einem langen extrazellulären N-terminalen Fragment (alpha-Kette oder NTF) und dem C-terminalen membrandurchspannenden Fragment mit intrazellulärer Domäne (beta-Kette oder CTF). Beide sind nicht-kovalent miteinander verbunden [2], sie entstehen durch eine autokatalytische Reaktion posttranslational im Endoplasmatischen Retikulum. Die Adhäsions-GPCR werden dabei an der hochkonservierten GPCR-Proteolytische-Region (GPS) prozessiert, die sich innerhalb der GAIN-Domäne, in der Nähe zur TM7-Region befindet [3]. Die GPS-Autoproteolyse ist für eine Signalweiterleitung einiger Adhäsions-GPCR, wie zum Beispiel für CD97, essentiell [4]. Die GAIN-Domäne verbindet die Protein-Domänen des N-terminalen Fragments mit dem C-terminalen Fragment [2]. Der besondere Aufbau der Adhäsions-GPCR, die zwei nicht-kovalent verbundenen Untereinheiten, eröffnet zahlreiche Möglichkeiten der Interaktion. Die Untereinheiten können separat als Adhäsions-Fragmente agieren und wahrscheinlich Signale weiterleiten oder nach Reassoziierung der einzelnen Ketten die Signaltransduktion der Zelle beeinflussen. Für einige Adhäsions-GPCR wurde gezeigt, dass die alpha-Kette bei Interaktion mit der beta-Kette zur Hemmung der konstitutiv aktiven beta-Kette führen kann. Ein Verlust der alpha-Kette durch Mutation könnte zu Angiogenese, Tumorstadium und Invasivität, also pathologischer Wirkung des Rezeptors führen. Die GAIN-Domäne scheint eine prädisponierte Stelle für Mutationen zu sein [2, 5]. In Anlage 1 ist der Aufbau der Adhäsions-GPCR schematisch dargestellt.

1.1.2. CD97

CD97 gehört zur Familie II der Adhäsions-GPCR (aGPCR). Diese ist durch das Vorhandensein von EGF-Domänen gekennzeichnet, sie werden daher als EGF-TM7 Rezeptoren bezeichnet [2]. Die

Struktur von Rezeptoren der EGF-TM7 Familie ist stellvertretend anhand von CD97 in der Abbildung 1.1.1 gezeigt. CD97 wurde 1994 auf aktivierten Leukozyten entdeckt [6]. Das Gen, welches CD97 kodiert, befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 (19p13.12-13.2) [7]. Die alpha-Kette (NTF) von CD97 trägt die EGF-Domänen und die Stalk-Region. [7, 8]. Die beta-Kette (CTF) enthält die TM7-Region und den intrazellulären Abschnitt des Rezeptors [2]. Vom human CD97 existieren drei Isoformen (siehe Abb. 1.1.1), die durch alternatives Splicen entstehen. Diese Moleküle enthalten drei (1,2,5), vier (1,2,3,5) oder fünf EGF-Domänen (1,2,3,4,5) [9]. In der PCR entstehen dabei primerabhängig ein 857bp (EGF1-5), 710bp (EGF1,2,3,5) und ein 578bp (EGF1,3,5) langes Produkt. Das Molekulargewicht für die deglykosylierten Formen nach einem Endo-F-Verdau lag bei 58, 64 und 71kDa für die drei Isoformen. Die Isoformen sind in Leukozyten sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene nachweisbar [10].

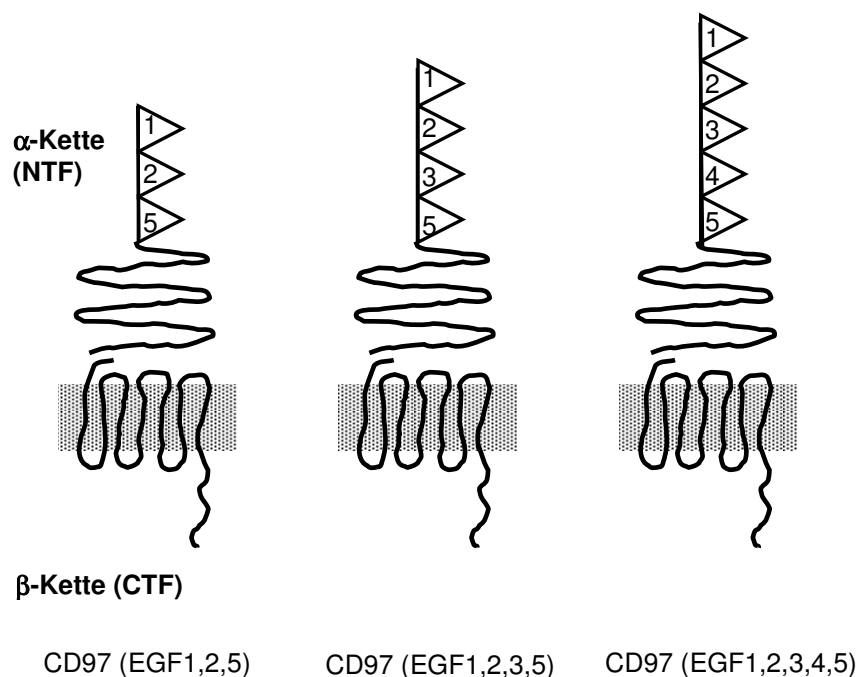


Abb. 1.1.1 Schematische Darstellung von hCD97

CD97 besteht aus einer alpha- (NTF) und beta- (CTF) Untereinheit. Es existieren drei Isoformen, die durch alternatives Splicen entstehen und drei, vier oder fünf EGF-Domänen exprimieren.

Abb. modifiziert nach Galle et al. [11].

Obwohl die extrazelluläre Region vom CD97 mit verschiedenen Liganden interagieren kann, wurde bisher kein Ligand identifiziert, der zur direkten Aktivierung vom CD97 führt. Die Liganden sind strukturell sehr verschieden voneinander. Gemeinsam ist, dass sie Extrazellulär-Matrix- (ECM) oder Zell-Zell-Interaktionen vermitteln können. CD55, Chondroitin B-Sulfat, CD90 (Thy-1) und die Integrine alpha5beta1 und alpha v beta3 wurden als Liganden beschrieben [12–15].

CD97 kann innerhalb der EGF-Domänen und in der Stalk-Region unterschiedlich stark N-glykosyliert werden. CD97 ohne N-Glykosylierung kann den Liganden CD55 nicht binden. N-Glykosylierung von CD97 kann durch Verwendung von Antikörpern gegen verschiedene Epitope gezeigt werden. EGF-spezifische Antikörper (CD97^{EGF}) können CD97 bei fehlender N-Glykosylierung nicht detektieren, solche gegen die Stalk-Region dagegen schon (CD97^{stalk}) [16].

Hämatopoetisches System

Die stärkste Expression von CD97 erfolgt von Zellen des hämatopoetischen Systems. Es wird auf allen Makrophagen und dendritischen Zellen, außer auf Gliazellen des Gehirns, exprimiert. CD97 wird in geringer Menge auf nahezu allen aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, aber nur auf wenigen intraepithelialen B-Zellen [17].

CD97 wird von glatter Muskulatur exprimiert.

Gefäße und glatte Muskulatur von Tumoren exprimieren CD97. Aorta und elastische Arterien sind CD97 negativ, dagegen zeigt die glatte Muskulatur venöser Gefäße eine Expression von nicht-glykosyliertem CD97. Leiomyome, benigne Tumoren glatter Muskulatur, zeigten eine zunehmende N-Glykosylierung. Auch manche, aber nicht alle untersuchten, Leiomyosarkomzellen zeigten eine Zunahme von N-glykosyliertem CD97 gegenüber gesundem Gewebe. Durch N-Glykosylierung von CD97 könnte die Invasivität und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen steigen [18].

Expression und Funktion von CD97 in Tumoren

Aust et al. konnten als erste Gruppe zeigen, dass CD97 auch außerhalb des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Von normalem Schilddrüsengewebe wird kein CD97 exprimiert, niedrig ist die CD97 Expression auf differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen. Von anaplastischen undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen wird CD97 dagegen stark exprimiert. Zusätzlich korreliert CD97 in Schilddrüsenkarzinomzellen direkt mit dem Tumorstadium und ist als Marker für Dedifferenzierung anzusehen [19]. CD97 wird von medullären Schilddrüsenkarzinomen (C-Zell-Karzinom) exprimiert und korreliert mit dem histopathologischen Stadium [20].

In kolorektalen Karzinomen konnte ebenfalls eine CD97 Expression gezeigt werden. Die stärkste Expression von CD97 zeigte sich dabei in den disseminierten (sog. „scattered“) Tumorzellen an der Invasionsfront des Tumors. Darüber hinaus zeigten Karzinome mit CD97 Expression in disseminierten Tumorzellen eine schlechtere Prognose mit stärkerer Lymphgefäßinfiltration, als solche, deren CD97 Expression in Zellen des soliden Tumors gleich verteilt war [21]. Gesteigerte Expression von CD97 und seinem Liganden CD55 an der Invasionsfront korreliert wahrscheinlich mit einem häufigeren Tumorrezidiv und Metastasierung in rektalen Adenokarzinomen [22]. CD97 wird außerdem häufig in Magen-, Ösophagus- und Pankreaskarzinomen exprimiert. Auch hier zeigte sich eine stärkere CD97 Expression in disseminierten Tumorzellen, als in Zellen, die im soliden Tumorgewebe lokalisiert waren. Die Expression von CD97 im Gewebe und die durchschnittliche Menge von löslichem CD97 im Serum der Patienten zeigten keine Korrelation mit den klinischen Daten des jeweiligen Patienten [23]. Zusammenfassend ist CD97 wahrscheinlich an der Entstehung und Ausbreitung von Karzinomen, sowie am Prozess der Metastasierung beteiligt. Daher ist die Aufklärung der durch CD97 aktivierten Signalwege von großem wissenschaftlichen und klinischen Interesse.

CD97 fördert Tumorausbreitung im Mausmodell

In verschiedenen Mausmodellen wurde die Funktion von CD97 in Tumoren untersucht. Dabei konnten die in der Immunhistologie an humanem Gewebe gewonnenen Ergebnisse verifiziert und erweitert werden. Durch subkutane Injektion von CD97 stabil überexprimierenden HT1080 Klonen in

immundefiziente *scid* Mäuse konnte gezeigt werden, dass das Tumoraufreten im Vergleich zur Kontrolle zeitiger erfolgt ist [11]. Ein Funktionsverlust der kurzen CD97 Isoform durch „knockdown“ von CD97/EGF1,2,5 in der Magenkarzinomzelllinie SGC-7901 führte nach subkutaner Inokulation in Mäusen zu einer verringerten Tumormasse und einer geringeren Tumorzellzahl in regionalen Lymphknoten. Das deutet eine mögliche Funktion vom CD97 bei der Ausbreitung von Tumoren an [24]. CD97 steigert außerdem die vaskuläre Invasion von follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen und die Entstehung von distalen Metastasen im Mausmodell. Die Lungenmetastasen zeigten dabei einen aggressiveren Phänotyp [25]. CD97 scheint zusätzlich eine Angiogenese-fördernde Wirkung zu haben. Die alpha-Kette von CD97(EGF1-5) steigert Angiogenese bei Verwendung des löslichen, gereinigten CD97 im direkten *in vivo* Angiogeneseassay (DIVAA). Weiterhin steigt die Vaskularisation im wachsenden CD97-exprimierenden Tumor. Die alpha-Kette interagiert dabei mit den CD97 Liganden Chondroitinsulfat-Proteoglykan und den Integrinen alpha5beta1 und/oder alpha v beta3. Diese Interaktion führt im Tierexperiment zur Endothelzellinvasion [14].

Funktion von CD97 in Tumorzellen

Die Liganden CD55 und Chondroitin B Sulfat werden in der Umgebung von kolorektalen Karzinomen überexprimiert. Dadurch ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Rolle von CD97 und seiner Liganden in der Tumorzellmigration. Aufgrund dieser Beobachtung und der hohen CD97 Expression in den disseminierten Tumorzellen wurde der Einfluss vom CD97 auf Migration untersucht [26, 27]. In kolorektalen Karzinomzelllinien korreliert die Expression von CD97 mit der Invasions- und Migrationsfähigkeit [21]. CD97 beschleunigt die Einzelzellmigration von Zellen der mesenchymalen Tumorzelllinie HT1080. Das an der TM7 Region verkürzte CD97-Konstrukt (TM2) verlangsamt interessanterweise die Einzelzellmigration der HT1080 Zellen. Daher könnte die Signaltransduktion von CD97 vom Vorhandensein der vollständigen TM7 Region und dem C-Terminalen Anteil abhängig sein [11]. CD97 steigert Zellaggregation in serumfrei-kultivierten HT1080 durch gesteigerte N-Cadherin Expression. Dies ist nur dann möglich, wenn posttranslational die GPS-Autoproteolyse erfolgt ist [4]. Ein Funktionsverlust der kurzen CD97 Isoform durch „knockdown“ von CD97 (EGF1,2,5) führt in der humanen Magenadenokarzinomzelllinie SGC-7901 zu verringerter Invasivität in eine gelatinebeschichtete Membran. Die sich bildenden Zellkolonien sind größer, die Zellen aggregieren dabei mehr an das bestehende Tumorsphäroid und bilden weniger disseminierte Kolonien als Zellen mit natürlicher CD97 Expression [24].

Signaltransduktion von CD97

Um neue Angriffspunkte in der Tumorthherapie zu entwickeln, ist es von wissenschaftlichem und klinischem Interesse, die Signaltransduktion von CD97 aufzuklären.

Überexpression von CD97 in Enterozyten der Maus lieferte erste Hinweise auf die Signaltransduktion, die durch CD97 reguliert wird. Es konnte eine Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Akt (pAkt Ser⁴⁷³), auch Proteinkinase B bezeichnet (PKB), bei gleichzeitiger Inaktivierung von Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) beta (pGSK3beta Ser⁹ gesteigert) und verminderter Phosphorylierung von beta-Catenin in den CD97 überexprimierenden Mäusen nachgewiesen werden [28].

Durch Heterodimerisation von CD97 mit LPAR1 (Lysophosphatidic Acid Receptor 1) wird die LPA-abhängige RHO-Signalweiterleitung gefördert und dadurch die Invasivität von Prostatakarzinomzellen gesteigert. Der LPAR1 ist vermutlich für die Signaltransduktion verantwortlich. Es wird RHO-GTP via $G\alpha_{12/13}$ gesteigert, weiterhin auch pAkt und pErk in diesen Zellen. Eine direkte Signaltransduktion für CD97 konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich ein Anstieg der Rezeptor-Signalweiterleitung, wenn anstatt des vollständigen CD97-Rezeptors nur die verkürzte beta-Kette (CTF) vorlag. Das deutet eine höhere konstitutive Aktivität der beta-Kette in Abwesenheit der mit der beta-Kette interagierenden extrazellulären Domäne der alpha-Kette (NTF) an [5]. Im Schilddrüsenepithel wurde durch CD97 ebenfalls indirekt pErk gesteigert [25]. Es sind also bereits einige Proteine bekannt, die durch CD97 reguliert werden. Offen ist allerdings, wie die Signaltransduktion vom Adhäsions-GPCR CD97 nach intrazellulär gewährleistet wird. Es sollen in dieser Arbeit weitere durch CD97 regulierte Proteine und Signalwege in HT1080 identifiziert werden.

1.1.3. Die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080

Die verwendete Modellzelllinie HT1080 ist eine humane Fibrosarkomzelllinie, aus einem hochmalignen mesenchymalen Tumor [29]. HT1080 zeichnen sich durch ihre geringere Adhärenz und den Mangel an Stressfasern, verglichen mit normalen Fibroblasten aus. Weiterhin sind sie hochinvasiv und in der Lage spontan in extrazelluläre Matrixkomponenten zu migrieren [30]. Da sie auf zweidimensionalen Matrizen als Einzelzellen sehr gut migrieren, sind sie zur Durchführung von zweidimensionalen (2D) Migrationsassays als Modellzellen gut geeignet. HT1080 zeigen eine endogene CD97 Expression.

CD97-stabil-überexprimierende HT1080 Zellen dienen als Modellsystem zur Untersuchung von Funktion und Signaltransduktion von CD97. Migrationsversuche von vereinzelt Modellzellen, die CD97 überexprimieren, liefern Ergebnisse, die gut auswertbar sind. Falls in diesen Versuchen eine Regulation der Migration zu finden ist, können weitere Versuche angeschlossen werden, die sich zur Identifikation regulierter Signalwege eignen. Durch den Einsatz von Inhibitoren in den Migrationsversuchen kann so auf möglicherweise beteiligte Proteine geschlossen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CD97-Überexpression in HT1080 die Migrationsgeschwindigkeit steigert. Expression des verkürzten Konstruktes CD97 (EGF1,2,5/TM2) reduziert dagegen die Motilität [11]. Der Vergleich der Migration von HT1080, die CD97 (EGF1,2,5), CD97(EGF1,2,5/TM2) oder mock exprimieren, soll also Unterschiede liefern. Diese Unterschiede in der Funktion müssen wahrscheinlich auf Unterschiede in der Signalweiterleitung zurückgeführt werden. Daher sollen die Signalmoleküle identifiziert werden, die in HT1080 durch Expression von CD97 (EGF1,2,5), CD97(EGF1,2,5/TM2) oder mock reguliert werden und für die Migrationssteigerung verantwortlich sind.

Dazu soll ein Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™) ausgewertet werden. Die identifizierten Proteine werden mittels Western Blot erweitert und verifiziert. Die Analyse der regulierten Proteine soll anschließend Hinweise auf weitere durch CD97-Überexpression regulierte Funktionen in HT1080 geben. Es ist nicht bekannt, ob die bis dato identifizierten Proteine die Steigerung der Migration durch CD97 in HT1080 vermitteln oder ob Zusätzliche beteiligt sind. Daher soll durch Einsatz von spezifischen Inhibitoren in zweidimensionalen (2D) Migrationsversuchen

untersucht werden, ob die identifizierten Proteine an der Steigerung der Migration durch CD97 beteiligt sind.

Einige Signalwege sind in diesen Zellen bereits konstitutiv aktiv. Das muss bei der Untersuchung der durch CD97-Überexpression-induzierten Signaltransduktion berücksichtigt werden. HT1080 besitzen ein konstitutiv aktives n-Ras-Allel, wodurch das nachgeschaltete Signalwegmitglied RhoA konstitutiv aktiviert wird [30]. Rho-Kinase und Myosin-light-chain-Kinase (MLCK) sind an der Regulation und der Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin 2 (MLC2) beteiligt. Rho-Kinase vermindert Adhäsion und Migration in HT1080 vermutlich durch Inhibierung der Myosin Aktivierung. MLCK könnte an der Kontrolle der Aktinorganisation während der Migration und Adhäsion in HT1080 beteiligt sein [31]. Weiterhin wird durch konstitutive Sekretion von Platelet Derived Growth Factor (PDGF) die Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) dauerhaft aktiviert, daraus resultiert ein konstitutiv aktives Akt in HT1080 [32]. Außerdem scheint die Proteinkinase C alpha an der Regulation der Migration in HT1080 beteiligt zu sein [33].

1.1.4. Regulation der Kinaseaktivität durch Proteinphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen an Serin, Threonin oder Tyrosin stellt eine weit verbreitete posttranslationale Modifikation dar, welche die Kinaseaktivität eines Proteins, aber auch seine subzelluläre Lokalisation reguliert. Proteinphosphatasen führen zur spezifischen Dephosphorylierung eines Proteins und kehren die Regulation damit um. Durch diese Regulationsmechanismen können Signalwege an- oder abgeschaltet werden. Der hier für die Tyrosinkinase beschriebene Mechanismus gilt in vergleichbarer Weise auch für die Aktivierung von Serin- oder Threoninkinasen. Zunächst wird eine Rezeptortyrosinkinase durch einen Wachstumsfaktor stimuliert. Anschließend erfolgt die Autophosphorylierung an multiplen Tyrosinresiduen des Rezeptors, der an der Membran lokalisiert ist. Wichtige Signaleenzyme werden zur Membran rekrutiert. Die SH2-Domäne dieser Enzyme bindet mit spezifischen Phosphotyrosin-Motiven an den Rezeptor. Es werden Schlüsselmoleküle (z.B. GTP-Ras, Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3), Inositol (1,3,4)-trisphosphate (IP3) und Diacylglycerol (DAG)) generiert, die eine Signalkaskade in Gang setzen. Es folgt die Phosphorylierung weiterer Proteine. Ein Protein kann meist an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden, dabei existieren Kinase-aktivierende oder -hemmende Phosphorylierungsstellen an einem Protein. Die reversible Phosphorylierung von Proteinen regelt nahezu alle Aspekte des Zellebens. Dabei wird nicht ausschließlich die Kinaseaktivität eines Proteins reguliert, sondern beispielsweise auch die Rate der Degradierung, die subzelluläre Lokalisation und die Interaktion mit anderen Proteinen oder Molekülen. Abnormale Proteinphosphorylierungen können ursächlich für oder eine Konsequenz der Tumorentstehung sein [34, 35].

1.1.5. Zellmigration

Migration ist ein komplex regulierter Prozess, der in der Tumorgenese bei der Entstehung von Metastasen große Bedeutung hat. Hier rückt die Zellmigration bei der Suche nach neuen Therapieansätzen in den Fokus des Interesses [36]. Bevor eine Zelle migrieren kann, muss sie sich aus dem bestehenden Zellverband lösen. Die Zellmigration ermöglicht anschließend eine Ausbreitung im Organismus entlang der Lymph- oder Blutgefäße.

Es werden grundsätzlich zwei Migrationsmodi von Einzelzellen unterschieden. Die **mesenchymale Migration** ist durch Ausbildung und Lösung fokaler Kontakte zur extrazellulären Matrix (ECM) geprägt und charakteristisch für Fibroblasten, glatte Muskelzellen, sowie für dedifferenzierte Epithelkarzinom-, Fibrosarkom- und Glioblastomzellen [37]. Die migrierende Zelle muss sich polarisieren und verlängern. Die durch Verlängerung des „leading edge“ gebildete Pseudopodie heftet sich an die ECM. Das ist an das Vorhandensein von filamentärem Aktin, sowie Signal- und Strukturproteinen, die eine dynamische Interaktion mit der ECM sichern, gebunden. Integrine binden an das Aktin-Zytoskelett durch Adaptorproteine, es entstehen fokale Kontakte. An der Bildung von fokalen Kontakten sind die Signalwege der PI3-Kinase, PKC und Rho-GTPasen beteiligt. Es werden Proteasen, wie z.B. MMP, Cathepsin und Collagenase sezerniert, die die ECM degradieren. Diese Proteasen werden in Karzinomzellen häufig vermehrt exprimiert. Actomyosinkontraktion führt zur Bewegung in Richtung fokaler Kontakte, der Zellkörper gleitet vorwärts. Lockerung der Adhäsionsstärke fördert bis zu einem bestimmten Grad die Migration.

Tumorzellen sind bei Inhibierung der mesenchymalen Migration in der Lage in einen amöboiden Migrationsmodus zu wechseln. Die **amöboide Migrationsform** ist z.B. charakteristisch für Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC), des kleinzelligen Prostatakarzinoms und Lymphomzellen. Migration entsteht durch sich schnell ändernde Zyklen von Expansion und Kontraktion des Zellkörpers. Die Zellen sind rund bis ellipsoid und extrem verformbar. Die Migration erfolgt weniger adhäsiv mit einer geringeren Affinität zum Substrat, ohne Degradierung der ECM. Sie ist Integrin- und Proteaseunabhängig. Amöboide Migration ermöglicht ein Ablösen vom Primärtumor und eine frühe Metastasenabsiedelung, wie es häufig in Lymphomen oder SCLS beobachtet wird [37]. In HT1080 konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von Proteasen ein Übergang von der mesenchymalen Form, welche in HT1080 die dominante Form darstellt, zu amöboider Migration möglich ist [38].

Einen Versuchsansatz um Migration von Zellen zu untersuchen, stellt die zweidimensionale (2D) Einzelzellmigration dar. Hierfür sind HT1080 Zellen besonders gut geeignet. Einen weiteren Versuchsansatz zur Untersuchung der Migration stellt der Wundverschluss (engl. *wound closure assay*) dar. Der Ablauf eines zweidimensionalen *in vitro* Wundverschlusses wurde für die Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 detailliert beschrieben. Zunächst erfolgt ein zeitiges unidirektionales Ausbreiten der Zellen, dann eine Zellbrückenbildung und als drittes die Migration in den Wundspalt [39]. Der Wundverschluss ist ein mögliches Modell, Migration von Zellen zu untersuchen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Wundverschluss durch Proliferation und Zell-Zell-Interaktionen benachbarter Zellen beeinflusst wird.

1.1.6. Apoptose, Proliferation und Zellzyklus

Zellfunktionen wie Proliferation, Zellzyklus und Apoptose können in Karzinomzellen modifiziert sein, dabei werden andere Signalkaskaden als in normalen Zellen gleichen Ursprungs aktiviert. CD97 könnte eine Rolle bei der Regulation von Proliferation, Zellzyklus und Apoptose spielen. Durch Identifikation CD97-regulierter Proteine, soll auf die damit verbundene Regulation dieser Zellfunktionen geschlossen werden.

Zellproliferation bezeichnet das Vermehren von Zellen, dabei ist einerseits Zellwachstum, andererseits die Zellteilung gemeint. In Proliferationsversuchen wird durch MTT-Assays die Vitalität der Zellen in einer Probe gemessen. Damit kann nur indirekt auf Zellteilungsrate geschlossen werden [40].

Die Zellproliferation ist ein Prozess, der im Rahmen des Zellzyklus stattfindet. Dabei ist die Zellteilung das Ergebnis der Mitose, die Schwesterchromatide werden getrennt. Wachstum und DNA-Synthese finden dagegen in der Interphase statt. Diese unterteilt sich weiter in G₁/G₀-, S- und G₂-Phase. CDKs spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Die CDK-Aktivierung wird dabei durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Untereinheiten und Phosphorylierungen gewährleistet.

Ist der Ablauf des Zellzyklus fehlerhaft, kommt es zur Apoptose der Zelle [41].

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Dabei werden die extrinsisch- und die intrinsisch-induzierte Apoptose voneinander unterschieden. Die extrinsische Apoptose wird durch extrazelluläre Stresssignale induziert, das wird durch Transmembranrezeptoren vermittelt. Diese Apoptoseform ist Caspase-abhängig. Die intrinsisch induzierte Apoptose kann Caspase-abhängig oder unabhängig sein. Sie wird durch eine Vielzahl intrazellulärer Stressfaktoren, wie zum Beispiel DNA-Schäden, oxidativen Stress, zytosolische Kalzium-Überladung, Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und anderer, ausgelöst. Die verschiedenen Apoptose-auslösenden Signale konvergieren auf mitochondriale Kontrollmechanismen. Es resultieren Störungen der mitochondrialen Membran, die ATP-Synthese kommt zum Erliegen, reaktive Sauerstoffspezies fallen vermehrt an. Es folgt eine Caspase-abhängige oder die Caspase-unabhängige Apoptose mit DNA-Fragmentierung [42].

1.2. Aufgabenstellung

CD97 ist ein Mitglied der Familie II der Adhäsions-GPCR (aGPCR), der EGF-TM7-Rezeptor Familie. Als heterodimeres Protein kann es Tumorzellen befähigen in intakte Gewebestrukturen einzudringen und gerichtet zu migrieren [2, 11, 24]. CD97 besteht aus einem langen extrazellulären N-terminalen Fragment (alpha-Kette, NTF), welches die EGF- und große Anteile der GAIN-Domänen trägt, und dem C-terminalen Fragment (beta-Kette, CTF), welches die TM7 Region und die intrazelluläre Domäne beinhaltet. Beide Untereinheiten sind durch nicht-kovalente Bindung miteinander verbunden [2]. CD97 ist in die Tumorprogression involviert. In kolorektalen Karzinomen und in gastrointestinalen Tumoren werden disseminierte (sog. „scattered“) Tumorzellen in der Invasionsfront nachgewiesen. Diese Zellen zeigten eine stärkere Expression von CD97 als Tumorzellen, die inmitten des soliden Tumorgewebes lokalisiert waren [21, 23]. In Schilddrüsenkarzinomzellen und in kolorektalen Karzinomen korreliert CD97 außerdem direkt mit dem Tumorstadium [19, 21]. In immundefizienten Mäusen konnte durch *in vivo* Experimente nachgewiesen werden, dass durch subkutane Injektion von CD97 das Tumoraufreten im Vergleich zur Kontrolle zeitiger erfolgte [11]. Weiterhin steigert CD97 in der Maus die vaskuläre Invasion von Schilddrüsenkarzinomzellen und die Entstehung von distalen Metastasen [25].

In vitro beschleunigt stabile Überexpression von CD97 (EGF1,2,5) die ungerichtete zweidimensionale (2D) Migration von vereinzelt Zellen der mesenchymalen Tumorzelllinie HT1080 [11]. Unbekannt ist, welcher Signalweg durch CD97 Überexpression in HT1080 zu dieser gesteigerten Migration führt. Um therapeutische Ansätze zu entwickeln, die CD97 als Target der Anti-Tumorthherapie nutzen, ist es wichtig, die Signaltransduktion des Moleküls aufzuklären.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, Signalwege zu identifizieren, die durch CD97-Überexpression in HT1080 reguliert werden. Weiterhin sollen die Signalwege identifiziert werden, die die CD97-induzierte Migrationssteigerung vermitteln.

Dazu stehen stabil-transfizierte HT1080 Klone zur Verfügung, die CD97 (EGF1,2,5), das C-terminal verkürzte Konstrukt CD97 (EGF1,2,5/TM2) und mock überexprimieren. CD97 (EGF1,2,5/TM2) besteht aus einem vollständigen NTF, d.h., aus extrazellulärem Anteil mit drei EGF-like Domänen, ist aber im CTF in den TM7 Domänen auf TM2 verkürzt und enthält daher auch nicht den intrazellulären C-terminalen Anteil. Als Kontrolle dienen mock, Zellen, die mit einem Konstrukt stabil transfiziert wurden, das die kodierenden Region von CD97 (EGF1,2,5) in antisense Richtung einkloniert enthält. Proteinphosphorylierung ist eine posttranslationale Regulationsmöglichkeit um Kinaseaktivität zu beeinflussen. Die Kenntnis darüber lässt Rückschlüsse auf regulierte Proteine zu. Durch Auswertung des Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™), einem Phospho-Assay zur Detektion von 37 Phosphorylierungsstellen verschiedener Signalmoleküle, sollen durch CD97 regulierte Proteine identifiziert werden. Diese werden hinsichtlich Gesamtexpression und Phosphorylierung mittels Western Blot verifiziert, um auf regulierte Signalwege schließen zu können. Nach Identifikation beteiligter Signalwege wird durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren in 2D-Migrationsversuchen überprüft, ob diese die CD97-gesteigerte Migration vermitteln.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Geräte

Axiovert 25 mit 10x Okular und 10x, 20x und 32x Objektiven	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
CCD Kamera	Hitachi Denshi Ltd., Tokyo, Japan
LiCor Odyssey	LiCor Biosciences, Lincoln, USA
ELISA Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Brutschrank Function Line	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biofuge fresco	Heraeus
Labofuge 400 Bench Top Centrifuge (Function Line)	Heraeus
Polyacrylamidgel Elektrophoresekammer Mini-Protean II 2D Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus	Eppendorf
Mixer Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Neubauer-improved Zählkammer	Optik Labor, Lancing, England
Rotor Shake Genie	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Rührer Monotherm Vario Mag	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
pH-Meter inoLab	WTW GmbH & Co. KG, Weilheim 2002 Deutschland
Waage Owa Labor	Nagema, Dresden, ehem. DDR
Präzisionswaage Toledo AE100	Mettler-Toledo, Inc., Columbus, USA
Tiefkühlschrank -80 °C TK VX 570S	Jouan, Unterhaching, Deutschland
Tiefkühlschrank -20°C Comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Stickstoffcontainer Escape 150	AIR liquide, Düsseldorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus

Tab. 2.1.1 Übersicht zu den verwendeten Geräten

Verbrauchsmaterial

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioScience, Inc., Keene, USA
Gel Blotting Filterpapier	Whatman International Ltd, Maidstone, Großbritannien
Petrischale 100x20mm	BD, Franklin Lakes, USA
Microtest Plate 96 Well Round Bottom	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1ml, 2ml	Sarstedt
Handschuhe Peha Soft	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Zellkulturflasche 75cm ²	Sarstedt
Zellschaber 24cm	TPP, Trasadingen Schweiz
6er, 12er, 24er, 96er Well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Culture-Insert	ibidi LLC, Verona, USA
PP Test Tube 15ml, 50ml	Greiner Bio-one
Cryo. S, PP mit Schraubverschluss	Greiner Bio-one
Auslaufpipetten	Sarstedt

Tab. 2.1.2 Übersicht zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BCA Protein Assay Kit (Bicinchoninsäure), Proteinbestimmung	Pierce Biotechnology, Thermo Scientific
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Roth
Chlorwasserstoff	J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Sigma
G418	Biochrom Ltd., Cambridge, Großbritannien
Glycin	Roth
Glycerol	Roth
Hygromycin B	Invitrogen
LiCor Blocking Buffer	LiCor Biosciences
beta-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	J. T. Baker
M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER)	Pierce Biotechnology, Thermo Scientific
Natriumlaurylsulfat (SDS) Ultra pure	Roth
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Protease Inhibitor Mix	Pierce Biotechnology, Thermo Scientific
Rotiphorese Gel 30	Roth
TEMED (99 %, p.a., N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tris-Base	Roth
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid	Apotheke Uniklinik Leipzig

Tab. 2.1.3 Übersicht zu den verwendeten Chemikalien

Inhibitoren:

Gehemmtes Enzym	Inhibitor	Firma	Katalognummer
Akt	Akt Inhibitor IV	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	124015
Myosin-light chain Kinase	ML-7	Calbiochem	475880
Rho-assoziierte Protein Kinase (ROCK-I) und ROCK II	Y-27632	Calbiochem	688001
Src	Src Inhibitor SU6656	Calbiochem	572636
PI3-Kinase	Wortmannin von Penicillium funiculosum	Sigma	W1628

Tab. 2.1.4 Übersicht über die bei der 2D-Migration und beim Wundverschluss verwendeten Inhibitoren

Puffer, Lösungen, Medien:

Puffer, Lösung, Medien	Herstellung
Tet-Medium für HT1080	DMEM 10% FKS 1% G418 0,1% Hygromycin
Einfriermedium für HT1080	40% DMEM 40% FKS 20% DMSO
Lysepuffer für HT1080	M-PER 1% Proteas Inhibitor Mix 1% EDTA
Lysepuffer für Zellen für KPSS 1.3 Assay (Kinexus, Bioinformatics Corporation, Vancouver, Kanada)	20 mM MOPS, pH 7,0 2 mM EGTA 5 mM EDTA 30 mM Natriumfluorid 60 mM beta-Glycerophosphat, pH 7,2 20 mM Natriumpyrophosphat 1 mM Natriumorthovanadat 1% Triton X-100 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 3 mM Benzamidin 5 µM Pepstatin A 10 µM Leupeptin 1 mM Dithiothreitol
Probenpuffer (4x) nach Kinexus Protokoll, 10 ml	5 ml 100% Glycerol 1,25 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 2 ml 20% SDS 0,80 ml 1% Bromphenolblau 0,45 ml dest. Wasser 50 µl/1ml beta-Mercaptoethanol frisch dazu
Sammelgelpuffer (4x)	1M Tris, pH 6,8, dafür 3,025g Tris/50ml, pH Einstellung mit HCl
Trenngelpuffer (4x)	1,5M Tris, pH 8,8, dafür 90,85g Tris/500ml, pH Einstellung mit HCl 2,00g SDS
Laufpuffer (10x), 1l	30,28 g Tris Base 144 g Glycin 10 g SDS pH 8,3 kontrollieren
Polyacrylamidgel 10%	4 ml Aqua dest. 3,3 ml Rotiphorese Gel 30 2,5 ml Trenngelpuffer 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% Ammoniumpersulfat 4 µl TEMED
Polyacrylamidgel 12%	3,3 ml Aqua dest. 4 ml Rotiphorese Gel 30 2,5 ml Trenngelpuffer 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% Ammoniumpersulfat 4 µl TEMED
Transferpuffer (10x), 1l	30,28 g Tris Base 144 g Glycin
Transferpuffer (1x)	0,1% SDS 20% Methanol 10% Transferpuffer (10x)
Waschpuffer/ TBS (10x), 1l	24,2 g Tris Base 80 g NaCl mit HCl auf pH 7,6 einstellen

TBS/T (1x), 1l	10% TBS (10x) 0,05% Tween-20
----------------	---------------------------------

Tab. 2.1.5 Übersicht zu den verwendeten Puffern, Lösungen und Medien

Antikörper:

Name des Protein	Abkürzung	Phosphorylierung	Firma	Klon	poly/monoklonal
alpha Tubulin	alpha Tubulin	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	DM1A	m
Cofilin	Cofilin	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA		p
pCofilin	pCofilin	Ser3	Cell Signaling		p
pExtracellular regulated protein-serine kinase 1/2 (p44/p42 MAP kinase)	pErk1 (p44 MAPK) und pErk2 (p42 MAPK)	Thr202/Tyr204 Thr185/Tyr187	Cell Signaling	D13.14.4E	m
pGlycogen synthase-serine kinase 3 beta	pGSK3 beta	Ser9	Cell Signaling		p
pGlycogen synthase-serine kinase 3 beta	pGSK3 beta	Tyr 279/Tyr216	EMD Millipore	5G-2F	m
LIM Kinase	LIMK1	-	Cell Signaling		p
pLIM1/ LIMK2 Kinase	pLIMK1,2	Thr508/Thr505	Cell Signaling		p
pMAP kinase-activated protein kinase 2	pMAPKAPK2	Thr334	Cell Signaling		p
pMAPK/ERK protein-serine kinase 1/2 (MKK1/2)	pMEK1/2	Ser 217/Ser221	Cell Signaling	41G9	m
pP70 ribosomal protein-serine S6 kinase	pP70S6K und pP85S6K	Thr389 Thr412	Cell Signaling	1A5	m
Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten	PTEN	-	Cell Signaling	26H9	m
pPhosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten	pPTEN	Ser380	Cell Signaling		p
Phosphoinositid-3-Kinase	PI3-Kinase p85	-	Cell Signaling	19H8	m
pPhosphoinositid-3-Kinase p55/p85	pPI3-Kinase p85 /p55	Tyr458/Tyr199	Cell Signaling		p
Phosphoinositid-3-Kinase Class III	PI3-Kinase Class III	-	Cell Signaling	D4E2	m
Phosphoinositid-3-Kinase p110alpha	PI3-Kinase p110alpha	-	Cell Signaling	C73F8	m
Phosphoinositid-3-Kinase p110beta	PI3-Kinase p110beta	-	Cell Signaling	C33D4	m
Phosphoinositid-3-Kinase	PI3-Kinase	-	Cell Signaling		p

p110gamma	p110gamma					
Phosphoinositide-dependent protein kinase 1	PDK1	-		Cell Signaling		p
pPhosphoinositide-dependent protein kinase 1	pPDK1	Ser241		Cell Signaling		p
Protein-serine kinase B alpha	Akt1	-		Cell Signaling	C73H10	m
pProtein-serine kinase B alpha	pAkt	Ser473		Cell Signaling	193H12	p
pProtein-serine kinase B alpha	pAkt	Thr308		Cell Signaling		p
Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	Raf1	-		Cell Signaling		p
pRaf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	pRaf1	Ser259		Cell Signaling		p
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	Src	-		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.	17AT28	m
pSrc proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	pSrc	Tyr529		Biosource, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland		p
Translation repressor protein 4E-BP1 (PHAS-1)	4E-BP1	-		Cell Signaling		p
pTranslation repressor protein 4E-BP1 (PHAS-1)	p4E-BP1	Thr37/Thr46		Cell Signaling		p

Tab. 2.1.6 Übersicht zu den im Western Blot verwendeten Primärantikörpern

m: monoklonal

p: polyklonal

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	gegen Spezies	hergestellt in	Kopplung	Firma
IRDye® 680 conjugated goat anti rabbit IgG	Kaninchen	Ziege	IRDye® 680	LI-COR Biosciences
IRDye® 800CW conjugated goat anti mouse IgG	Maus	Ziege	IRDye® 800CW	LI-COR Biosciences
IRDye® 800CW conjugated goat anti rat IgG	Ratte	Ziege	IRDye® 800CW	LI-COR Biosciences

Tab. 2.1.7 Übersicht zu den im Western Blot verwendeten Sekundärantikörpern

Klonierung der Zellen

HT1080	BD Clontech, Heidelberg, Germany
pBI-EGFP	Clontech
pWE-4	Clontech

Tab. 2.1.8 Übersicht zu der verwendeten Zelllinie und den verwendeten Vektoren

Multi-Immunoblot™

Kinetworks™ Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling Multi-Immunoblot™	Kinexus, Bioinformatics Corporation, Vancouver, Kanada
---	---

Tab. 2.1.9 Übersicht zu dem verwendeten Multi-Immunoblot™

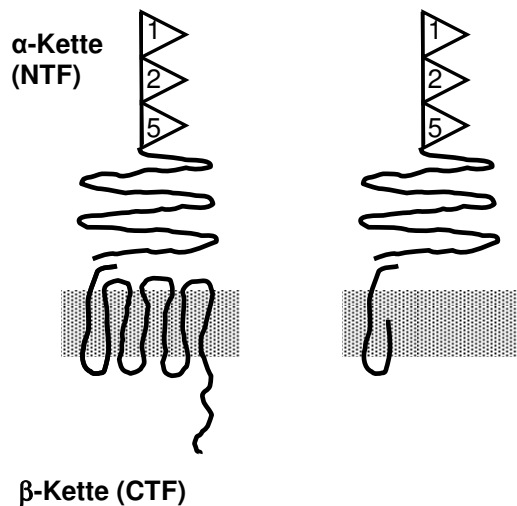
2.2. Methoden

2.2.1. Generierung der HT1080 Klone

Für die durchgeführten Untersuchungen wurde die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 Tet-off verwendet. Dabei wurden solche HT1080 Zellen untersucht, die verschiedene CD97-Konstrukte stabil überexprimieren. Die Transfektion der HT1080 Zellen mit dem entsprechenden Vektor wurde durch die Arbeitsgruppe Frau Prof. Aust durchgeführt und ausführlich beschrieben [21]. CD97(EGF1,2,5) cDNA wird mittels PCR aus dem Vektor pcDNA3.1/Zeo+ umklontiert. Dazu sind Primer nötig, die MluI und NheI Schnittstellen generieren (PrCD97 *MluI*: 5'-cga cgc gtg cca cca tgg gag gcc gcg-3'; PrCD97 *NheI*: 5'-aac gct agc cct tga tat gcc gga-3' und PhCD97stop.rev *MluI*: 5'-cga cgc gtg cca cca tgg gag gcc gcg-3'; PhCD97stop.rev *NheI*: 5'- tca aag cta gcc atc gag ccc tgg atg ggc cgc acc-3'). Die cDNA wird anschließend in die MluI und NheI Schnittstellen des pBI-EGFP-Vektors einkloniert. Es erfolgt die Co-Transfektion von 5µg pBI-EGFP-CD97 (EGF 1,2,5) und 250 ng pWE-4 in die HT1080 Zellen durch Elektroporation. Der pBI-Vektor enthält keine Resistenz, dafür zusätzlich das Grün Fluoreszierende Protein (GFP). Die Co-Expression des GFP kann daher als Kontrolle für die Anwesenheit des pBI-Vektors dienen. Eine Hygromycin-Resistenz wird durch den pWE-4-Vektor vermittelt. Zugabe von 100µg/ml Hygromycin zum Medium 2 Tage nach der Transfektion führt zur Selektion der vektorpositiven Zellen. Bei statistisch verteilter Aufnahme beider Vektoren während der Transfektion wird so eine stabile Expression erreicht. Die CD97 Überexpression wird regelmäßig flowzytometrisch überprüft. Nur Präparationen, in denen mindestens 90% der Zellen eine Überexpression zeigen, werden für die Untersuchung genutzt. Die HT1080 Klone werden in DMEM, 10% FKS kultiviert, unter Zugabe von 100µg/ml G418 und 1µg/ml Hygromycin B. Das Gesamtkonstrukt CD97(EGF1,2,5) besteht aus dem extrazellulären NTF (alpha-Kette (EGF1,2,5)) und einem vollständigen CTF (beta-Kette) mit der sieben-transmembranären (TM7) Region und dem intrazellulären Teil. CD97(EGF1,2,5/TM2) besteht aus einem vollständigen extrazellulären NTF mit den drei EGF-like Domänen und einer Transmembranregion, welche in den TM7 Domänen auf TM2 verkürzt ist. Es enthält daher auch nicht den intrazellulären C-terminalen Anteil. Beide Konstrukte sind in Abbildung 2.2.1 schematische dargestellt. Als Kontrolle dienen mock-transfizierte HT1080. Diese Zellen sind mit einem Konstrukt stabil transfiziert, das die kodierende Region von CD97 (EGF1,2,5) in antisense Richtung einkloniert enthält. Die CD97 Expression in mock-transfizierten HT1080 ist vergleichbar der bei Wildtyp Zellen. Die verwendeten HT1080 Zellen sind in der Tabelle 2.1.1 mit genauer Bezeichnung und der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzung dargestellt.

Bezeichnung	verwendete Abkürzung	Beschreibung
HT1080 CD97 (EGF1, 2, 5)	TM7	Wt CD97
HT1080 CD97 (EGF1, 2, 5/ TM2)	TM2	Verkürzte Transmembrandomäne
HT1080 CD97 (EGF1, 2, 5) mock	mock	Antisense Konstrukt

Tab 2.2.1 Übersicht über die stabil CD97 transfizierten HT1080 Zellen



CD97 (EGF1,2,5)

CD97 (EGF1,2,5/TM2)

Abb. 2.2.1. Schematische Darstellung der stabil in HT1080 transfektierten CD97-Konstrukte CD97 (EGF1,2,5) und CD97 (EGF1,2,5/TM2)

Als Kontrolle dient mock (Antisense-Konstrukt), nicht abgebildet, es entsteht kein funktionelles Protein.

2.2.2. Präparation der Zellen für das Kinetix Networks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™)

Die Präparation der HT1080 Zellen wurde laut Protokoll von Kinexus durchgeführt. Für den Multi-Immunoblot™ KPSS 1.3 sind 500µg Zelllysate mit einer Endkonzentration von 1mg/ml Protein nötig. Dazu werden 1×10^6 Zellen in einer 100x20mm Petrischale ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dadurch ergeben sich ca. 1×10^7 adhärenente Zellen pro Petrischale. Diese werden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 100µl eiskalter Lysepuffer dazu pipettiert. Dieser Lysepuffer enthält Reagenzien, die als Phosphatase-Inhibitoren wirken und somit die bestehenden Proteinphosphorylierungen konservieren. Die Zellen werden mit einem Gummischaber abgeschabt. Das Zelllysate wird in ein Reaktionsgefäß überführt und vier Mal für 10 Sekunden im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation bei mindestens 100 000 x g für 30 Minuten bei 4°C wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Proteinkonzentration mittels BCA bestimmt. Dabei ist BSA als Proteinstandard für die Eichkurve zu verwenden. Die Proben werden gemeinsam mit Probenpuffer und beta-Mercaptoethanol auf eine Endkonzentration von 1mg/ml Protein eingestellt und ohne Kühlung an Kinexus verschickt. Das dort durchgeführte Screening entspricht einem optimierten Western Blot für 37 verschiedene Proteinphosphorylierungsstellen (Multi-Immunoblot™) [43].

2.2.3. Präparation der Zellen für Western Blot

Für den Western Blot werden 1×10^6 Zellen für 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen sind dann subkonfluent. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des Gummischabers vom Untergrund abgeschabt. Nach Suspension mit der Pipette werden die Zellen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Sie werden bei 300 x g in der Tischzentrifuge für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 100µl Lysepuffer mehrmals resuspendiert. Es folgt die Inkubation für 10 Minuten auf Eis

und anschließend eine Zentrifugation bei 16 000 x g für 15 Minuten. Der Überstand ist das Lysat der Zellen. Für das Lysat muss die Proteinkonzentration mittels BCA ermittelt werden. Als Proteinstandard dient BSA für die Eichkurve. Die Proben werden gemeinsam mit Probenpuffer und beta-Mercaptoethanol auf eine Endkonzentration von 1mg/ml Protein eingestellt. Die Proben werden bei 95°C für 5 Minuten gekocht, à 25µl aliquotiert und können bei -80°C gelagert werden.

2.2.4. Western Blot

Für die Elektrophorese wird ein Polyacrylamidgel gegossen, welches aus einem 10%-oder 12%igem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel mit 10 Slots besteht. Pro Slot werden im Sammelgel 20µg Protein aufgetragen und bei 200 V und ca. 50 Minuten Laufzeit die Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Trenngel getrennt. Zum Bestimmen des Molekulargewichts der Proteine läuft ein Molekularstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) im Gel mit. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran, das Filterpapier und das Acrylamidgel werden zunächst für 15 Minuten im Transferpuffer gelagert. Der Transfer erfolgt in „Sandwich-Technik“ bei 20 V für 30 Minuten. Die Membran wird mit Aqua dest. gewaschen und mit Ponceau-S gefärbt. Dadurch werden die Proteine reversibel gefärbt und zusätzlich an der Membran fixiert. Überschüssiges Ponceau-S wird mit Wasser abgewaschen. Die Membran wird nun in Odyssey Blocking Buffer für ca. 30 Minuten inkubiert und anschließend für 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Primärer und sekundärer Antikörper werden in 1:1 TBS/T und Odyssey Blocking Buffer verdünnt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt bei 4°C über Nacht, die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur. Die Membran wird nach Inkubation mit den Antikörpern für jeweils 3 x 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Die Entwicklung und anschließende Auswertung erfolgt am LiCor Odyssey und der Image Studio Software 1.0.4 LiCor. Die Proteinexpression und Phosphorylierung wurde als graphische Übersichtsdarstellung in Form eines „Heat Map“ verdeutlicht. Dazu wurde der „Multi Experiment Viewer“ (MeV_4_8_1, TM4 Software Development Team) [44] verwendet.

2.2.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse im Western Blot

Durch CD97 Überexpression wird in HT1080 Zellen die Gesamtmenge und der Phosphorylierungsstatus einiger Proteine verändert. Mit Hilfe des LiCor Odyssey ist es möglich, semiquantitative Aussagen hinsichtlich der Proteinexpression und Phosphorylierung zu treffen. Die Emission, die durch fluoreszenz-markierte Antikörper bei Bindung an das untersuchte Antigen ausgesendet wird, liefert Werte, die über einen weiten Messbereich linear sind hinsichtlich der ermittelten Signalstärke. Die gemessenen Daten von TM7 und TM2 werden zu mock ins Verhältnis gesetzt. Aus mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen werden der Mittelwert und der Fehler der Standardabweichung (SEM) errechnet.

Die im Western Blot gewonnen Ergebnisse sollen hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz beurteilt werden. Hierzu wurde das Statistikprogramm „R“ (Version 2.13.1, 08.07.2011, The R Foundation for Statistical Computing) mit Zusatzprogrammen verwendet. Bei der vorliegenden geringen Stichprobengröße von n=3 muss die Varianz regularisiert, d. h. geschätzt werden. Dazu wird das R-Paket „st“ genutzt [45]. Für jedes untersuchte Protein wird eine regularisierte t- Statistik berechnet und

die zugehörigen p-Werte werden für multiples Testen korrigiert, wozu sich im vorliegenden Versuchsaufbau die Benjamini-Hochberg-Regel eignet [46]. Diese ist im R-Paket „mutoss“ in der Funktion „BH“ implementiert. Dadurch wird die Rate der Typ I Fehler festgelegt, die höchstens gemacht werden soll, die sogenannte False Discovery Rate - FDR. [47]. Für $FDR < 0,1$ ergeben sich also beispielsweise höchstens 10% falsch positive Testergebnisse zum Signifikanzniveau 10 %, d.h., in höchstens 10% der Fälle wird die Nullhypothese abgelehnt, obwohl sie wahr ist. Die FDR wird auf 0,1 festgesetzt. Dieser Schwellenwert ergibt sich aus optischer Interpretation des p-Werte Histogramms, das für entsprechend kleine p-Werte einen deutlichen Ausschlag aufweist. 14 der untersuchten Proteine waren dabei im Western Blot hinsichtlich Menge und/oder Phosphorylierungsstatus signifikant verändert beim Vergleich von TM7 zu mock und TM2. Entsprechend findet sich also circa ein falsch positiv bestimmtes Protein.

2.2.6. 2D-Einzelzellmigration

Um die 2D-Einzelzellmigration der HT1080 Zellen zu bestimmen, wurde das bestehende Modell von Dickens et al. für die Berechnung der Zellmigration angepasst. Es handelt sich dabei um ein zweidimensionales Modell für die gleichzeitige Migration vieler Einzelzellen. Als Voraussetzung gilt, dass die Zellen unabhängig voneinander migrieren können, sodass eine Interaktion der Zellen untereinander mit Beeinflussung der Migrationsrichtung ausgeschlossen wird. Dabei bleibt die Bewegung der Zellen über einen kurzen Zeitraum in die gleiche Richtung bestehen, während es über einen längeren Zeitpunkt zu einer zufälligen Änderung der Richtung kommt. Der Abstand der Positionen zum Zeitpunkt eins und zwei sollen dann für alle Zellen bestimmt werden. Daraus lässt sich das Mittel der Abstände zueinander ermitteln [48]. In Abbildung 2.2.2 ist das Verfahren veranschaulicht.

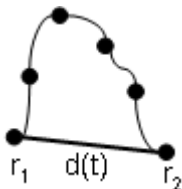


Abb. 2.2.2 Schema der 2D-Migration einer Einzelzelle

Einzelzellen migrieren über einen kurzen Zeitabstand in konstanter Richtung, über einen langen wird die Richtung zufällig verändert. Nach einer konstanten Zeit (t) soll der Abstand der beiden Positionen bestimmt werden, $d(t)$.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer 96er Well Platte mit $2,5 \times 10^2$, 5×10^2 , 1×10^3 und 2×10^3 Zellen/Well in DMEM mit 10% FKS.

Es werden Bilder drei Stunden ($t = 1$) nach der Zellaussaat und 16 Stunden ($t = 2$) nach der Aussaat mit der Axiovert 25-Kamera angefertigt. Dieser Zeitabstand wurde gewählt, da innerhalb der ersten drei Stunden nach Zellaussaat die Adhäsion der Zellen an den Untergrund stattfindet. In den folgenden 13 Stunden findet eine ungerichtete 2D-Zellmigration statt, die Zellteilung erfolgt erst nach diesem Zeitintervall. Mit dem Programm „tracer“ (Version 1.0, Januar 1998, Marcus Karolewski) werden anschließend die Koordinaten von mindestens 20 Zellen zu beiden Zeitpunkten bestimmt. In drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen werden je 5 Bilderpaare fotografiert und ausgewertet, d.h. es werden mindestens 100 Zellen/Klon je Ansatz ausgewertet. Der Abstand $d(t)$ für

jede Zelle wird ermittelt. Anschließend wird das quadratische Mittel der Änderung des Abstandes der migrierenden Zellen zueinander bestimmt. Dies erfolgt mit Hilfe eines für „Excel“ (Microsoft Corporation, Redmond, USA) geschriebenen „Makros“. Es gilt dabei:

$$\langle d^2(t) \rangle = 2n_d Dt$$

$\langle d^2(t) \rangle$: quadratische Mittel der Abstände
 n_d : Nummer der Dimension der Migration
 D : Migrationskoeffizient
 t : Zeit

Daraus ergibt sich der Migrationskoeffizient D für die 2D-Migration:

$$D = \frac{\langle d^2(t) \rangle}{8t}$$

Anschließend erfolgt eine Umrechnung von der Maßeinheit „Pixel“ in Meter.

2.2.7. Einzelzellmigration unter dem Einfluss von Inhibitoren

Um den Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf die 2D-Migration der HT1080 Zellen untersuchen zu können und dadurch weitere Informationen zu den maßgeblich beteiligten Signalwegen zu erhalten, wurden zum Kulturmedium unterschiedliche Inhibitoren zugesetzt, siehe dazu Tabelle 2.1.4. Die Inhibitoren wurden direkt dem Zellansatz hinzu gegeben, in einer Konzentration von Akt Inhibitor IV 500nM, SU6656 5µM und Wortmannin 1µM.

Die verwendeten Inhibitoren sind in DMSO gelöst, daher wurde 0,1% DMSO dem Kontrollansatz zugefügt.

2.2.8. Signifikanzprüfung des Migrationskoeffizienten

Es wurden der Mittelwert und der Fehler der Standardabweichung (SEM) mittels Excel ermittelt. Bei hinreichend großer Stichprobe und normalverteilter Grundgesamtheit eignet sich der T-Test zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit, der Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art zu begehen. Die Nullhypothese wird dann abgelehnt, obwohl sie wahr ist. Dabei gilt als Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant ($p < 0,01$ als sehr signifikant, $p < 0,001$ hoch signifikant).

2.2.9. Wundverschluss in HT1080

Das Culture-Insert von Ibidi wurde für den Wundverschluss der HT1080 verwendet. Es besteht aus zwei Kammern mit je 0,22 cm² Fläche. Das Culture-Insert wird auf eine Zellkulturschale mit 3,9 cm³ Durchmesser aufgebracht, die Schale wird mit 860µl Medium befüllt. In jede der zwei Kammern des Culture Inserts werden 2x10⁴ Zellen in 70µl Medium ausgesät und für 22 Stunden inkubiert. Die Kammern sind durch einen 500µm (± 50µm) großen Spalt getrennt, dadurch wird eine definierte Wundgröße gewährleistet. Nach 22 Stunden wird der Culture-Insert mit einer sterilen Pinzette entfernt. Zu diesem Zeitpunkt beginnt der Wundverschluss (Zeitpunkt Null). In 3 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen ($n=3$) je Klon wird die verbleibende Wundfläche in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Es werden Serien von je drei Einzelfotos mit der Axiovert 25-Kamera über den gesamten Wundbereich aufgenommen und daraus die Wundfläche zu diesem Zeitpunkt gemittelt. Über einen

Zeitraum von 30 Stunden wird auf diese Weise der Wundbereich alle drei Stunden dokumentiert. Anschließend wird mit dem Software-Programm „ImageJ“ (Version 1.38x, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) die verbleibende Wundfläche zu jedem Zeitpunkt ermittelt und gegen den Ausgangswert zum Zeitpunkt Null verrechnet.

2.2.10. Wundverschluss unter dem Einfluss von Inhibitoren

Um die Signalwege, die an der Regulation des Wundverschlusses beteiligt sind, genauer untersuchen zu können, werden spezifische Inhibitoren dem Ansatz zugefügt (Tab.2.1.4). Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von Akt Inhibitor IV 500nM, SU6656 5µM und Wortmannin 1µM sowie Y27632 10µM und ML7 20µM zugesetzt. Die verwendeten Inhibitoren wurden in 0,1 % DMSO gelöst, daher wurde 0,1% DMSO dem Kontrollansatz zugefügt.

3. Ergebnisse

3.1. CD97 reguliert die Phosphorylierung zahlreicher Proteine: Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™)

In HT1080 Zellen wurde die Phosphorylierung verschiedener Proteine in Abhängigkeit vom exprimierten CD97 Konstrukt untersucht. Mittels optimiertem Western Blot (Multi-Immunoblot™ von Kinexus Bioinformatics) wurden 37 Phosphorylierungen verschiedener Proteine ermittelt (n=1). Bei diesem Multi-Immunoblot™ zeigte sich, dass durch CD97 zahlreiche Proteine reguliert werden. In der Tabelle 3.1 sind die regulierten Proteine mit der für die HT1080 Zellen wichtigsten Zellfunktion im Überblick erfasst. Die Darstellung zeigt die normalisierten Zählimpulse pro Minute (*counts per minute*) für jede Proteinphosphorylierung in Abhängigkeit der drei exprimierten CD97-Konstrukte in den HT1080. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 3.1.1 ein Heat Map aller Proteine dargestellt, bei denen eine Phosphorylierung detektiert wurde. In Anlage 3 ist der vollständige Kinetworks Antibody Panel aus der durchgeführten Untersuchung abgebildet.

Name des Protein	Abkürzung	Phosphorylierung	Normalisierte counts per minute (cpm)			Funktion
			mock	TM2	TM7	
Adducin alpha (ADD1)	Adducin alpha	Ser726	260	987	1002	Zellmigration, s. Kap. 4.1.1.4.
Adducin gamma (ADD3)	Adducin gamma	Ser693	270	605	320	Zellmigration, s. Kap. 4.1.1.4.
B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)	B23	Ser4	6622	5103	4340	Steuerung der Mitose und damit des Zellzyklus, s. Kap. 4.1.4.
cAMP response element binding protein 1	CREB	Ser133	150	101	255	Aktivierung durch Akt1, Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.1.
Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	CDK1/2	Tyr15	193	642	338	Zellzyklusprogression, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.4.
Double-stranded RNA-dependent protein-serine kinase	PKR1	Thr451	212	137	227	Zellproliferation, Aktivierung von JNK und Akt, s. Kap. 4.1.2.2.
Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase)	Erk1	Thr202+Tyr204	75	98	67	Apoptose, Autophagie, s. Kap. 4.1.2.1.
Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase)	Erk2	Thr185+Tyr187	289	506	220	Apoptose, Autophagie, s. Kap. 4.1.2.1.
Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha	GSK3 alpha	Tyr279	177	310	597	Regulation zellulärer Prozesse, aktivierende Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.1.1.
Glycogen synthase-serine kinase 3 beta	GSK3 beta	Tyr216	653	711	1302	Regulation zellulärer Prozesse, aktivierende Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.1.1.
Jun N-terminus protein-serine kinase	JNK	Thr183+Tyr185	72	74	73	aktiviert Jun, Zellzyklus, s. Kap. 4.1.2.2.
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor (37)	Jun	Ser73	1500	1333	2274	Zellzyklusprogression und Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.2.
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor (39)	Jun	Ser73	224	164	301	Zellzyklusprogression und Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.2.
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor (41)	Jun	Ser73	92	46	98	Zellzyklusprogression und Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.2.
MAPK/ERK protein-serine kinase 1/2	MEK1/2	Ser218+Ser222	90	109	182	Aktivierung durch Raf1, aktiviert Erk1/2, s. Kap. 4.1.2.1.
Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1 (66)	MSK1 (MSK2)	Ser376	96	59	220	Effektorprotein des Erk-Signalweges, Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.1.

Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1 (74)	MSK1	Ser376	135	93	76	Effektorprotein des Erk-Signalweges, Apoptoseschutz, s. Kap. 4.1.2.1.
p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha	P70S6K	Thr389	251	202	395	Zellzyklusprogression, verhindert die Translation, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.3.
p85 ribosomal protein-serine S6 kinase 2	P85S6K	Thr412	823	882	693	Zellzyklusprogression, verhindert die Translation, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.3.
Protein-serine kinase C alpha	PKC alpha	Ser657	13780	13444	12247	Zellmigration, s. Kap. 4.1.1.4.
Protein-serine kinase C alpha/beta II	PKC alpha/beta II	Thr638/Thr641	3988	3784	3329	Zellmigration, s. Kap. 4.1.1.4.
Protein-serine kinase C delta	PKC delta	Thr507	54	37	86	Zellmigration, s. Kap. 4.1.1.4.
Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase (63)	Raf1 (Isoform 2)	Ser259	47	74	246	Schlüsselpotein im MAPK/Erk-Signalweg, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.2.1.
Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase (60)	Raf1 (Isoform 1)	Ser259	38	96	111	Schlüsselpotein im MAPK/Erk-Signalweg, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.2.1.
Retinoblastoma-associated protein 1	Rb	Ser780	166	501	552	hemmt Zellzyklusprogress, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.3.
Retinoblastoma-associated protein 1	Rb	Ser807+Ser811	58	156	230	hemmt Zellzyklusprogress, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.3.
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	Ser727	123	91	142	steigert Akt1 Expression auf Genebene, s. Kap. 4.1.1.1.
SMA- and mothers against decapentaplegic homologs 1/5/9	Smad 1/5/9	Ser463+Ser465/ Ser463+Ser465/ Ser465+Ser467	277	411	572	Genexpression, s. Kap. 4.1.5.
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase (46)	Src (Isoform 2)	Tyr529	873	978	1144	Zellmigration, bildet Komplex mit FAK, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.1.2.
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase (44)	Src (Isoform 1)	Tyr529	630	601	679	Zellmigration, bildet Komplex mit FAK, inhibitorische Phosphorylierung, s. Kap. 4.1.1.2.

Tab. 3.1: Überblick über die Phosphorylierung der untersuchten Proteine in HT1080 Zellen in Abhängigkeit vom exprimierten Konstrukt (Multi-Immunoblot™, Katalognummer KPSS 1.3, Vergleichsdarstellung zur Bestellung vom 14.10.2009)
In HT1080 mock, CD97/TM2 und CD97/TM7 wurde für n=1 der Phosphorylierungsstatus der in der Tabelle angegebenen Proteine als Zählimpulse pro Minute (cmp) ermittelt. CD97/TM7 Überexpression beeinflusst die Phosphorylierung zahlreicher Effektorproteine von Signalwegen der Migration, Zellproliferation und Apoptose im Vergleich zu mock und CD97/TM2. Überblicksdarstellung zur Funktion der untersuchten Proteine und Verweis zum Kapitel mit der genauen Erläuterung.

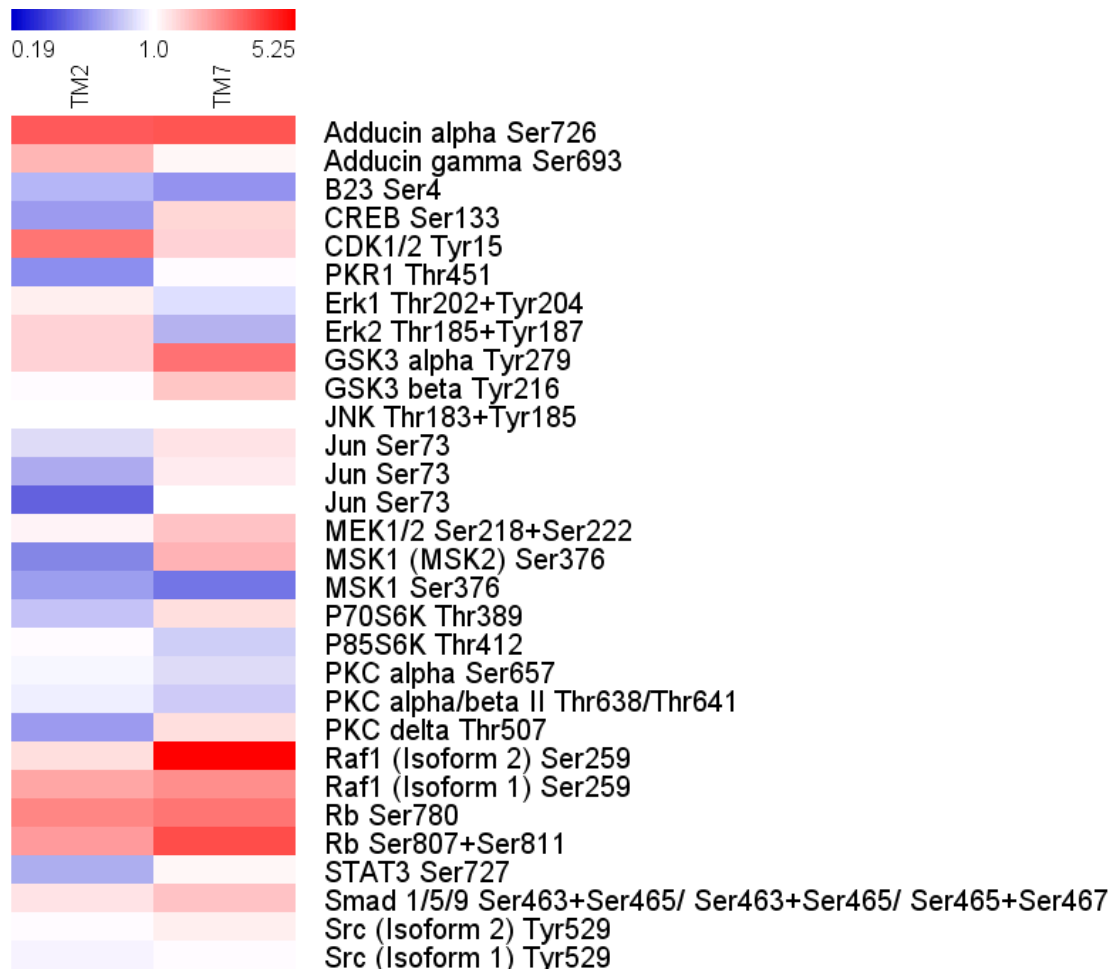


Abb. 3.1.1 Heat Map der Proteinphosphorylierung in den HT1080 Zellen

Die Phosphorylierung der Proteine in TM7 und TM2 wurden ins Verhältnis zu mock gesetzt und dann gegeneinander abgetragen. Daher gilt für mock = 1, hier liegt die Mitte der verwendeten Skalierung. (1= weiß = keine Änderung zu mock). Die größte Änderung im Vergleich zu mock beträgt 5,23, daher ist 5,25 als Maximalwert der Skalierung mit der Farbe Rot festgelegt. Das Maximum der Verringerung ist das Reziproke von 5,25 und bildet das Minimum der Skalierung mit 0,19, Farbe Blau.

15 der 37 untersuchten Proteinphosphorylierungen waren in **TM7 im Vergleich zu TM2 und mock stärker phosphoryliert**. In der Heat Map sind diese Proteine bei TM7 stärker rot gefärbt.

Die größten Unterschiede bestanden für MSK1 (MSK2) Ser³⁷⁶ (+ 73% zu TM2, + 56% zu mock), Raf1 (Isoform 2) Ser²⁵⁹ (+ 70% zu TM2, + 81% zu mock), CREB Ser¹³³ (+ 60% zu TM2, + 41% zu mock), pRb Ser⁸⁰⁷ + Ser⁸¹¹ (+ 32% zu TM2, + 75% zu mock) und GSK3 alpha Tyr²⁷⁹ (+ 48% zu TM2, + 70% zu mock).

Adducin alpha Ser⁷²⁶ war in **TM7 und TM2 nahezu gleichstark** phosphoryliert und stärker als in mock (+ 74%). Im Heat Map ist das durch eine stärkere Rotfärbung in TM7 und TM2 zu sehen.

Sieben Proteine waren in **TM7 weniger phosphoryliert als in TM2 und mock**. In der Heat Map sind diese Proteine bei TM7 stärker blau gefärbt. Die größten Unterschiede bestanden für Erk2 Thr¹⁸⁵ + Tyr¹⁸⁷ (- 130% zu TM2, - 31% zu mock), pErk1 Thr²⁰² + Tyr²⁰⁴ (- 46% zu TM2, - 12% zu mock), P85S6K Thr⁴¹² (- 27% zu TM2, - 19% zu mock), pMSK1 Ser³⁷⁶ (- 22% zu TM2, - 78% zu mock).

JNK Thr¹⁸³ + Tyr¹⁸⁵ war in **TM7, TM2 und mock gleichstark** phosphoryliert. Im Heat Map ist das durch eine weißliche Einfärbung erkennbar.

Zwei Proteine waren in **TM7 weniger phosphoryliert als in TM2, aber stärker als in mock**. In der Heat Map sind diese Proteine für TM2 stärker rot gefärbt. Es waren Adducin gamma Ser⁶⁹³ (- 89% zu TM2, + 16% zu mock) und CDK1/2 Tyr¹⁵ (- 90% zu TM2, + 43% zu mock)

12 Phosphorylierungsstellen der 37 untersuchten waren **nicht phosphoryliert**: GSK3 alpha Ser²¹, GSK beta Ser⁹, MEK3/6 Ser¹⁸⁹/Ser²⁰⁷, p38 alpha MAPK Thr¹⁸⁰ + Tyr¹⁸², NR1 Ser⁸⁹⁶, PKB alpha (Akt1) Ser⁴⁷³, PKB alpha (Akt1) Thr³⁰⁸, PKC epsilon Ser⁷²⁹, RSK 1/3 Thr³⁵⁹ + Ser³⁶³/ Thr³⁵⁶ + Ser³⁶⁰, STAT 1 Tyr⁷⁰¹, STAT5A Tyr⁶⁹⁴, und Src Tyr⁴¹⁸.

Diese Proteine sind in der Tab. 3.1 und in der Heat MAP Abb. 3.1.1 nicht enthalten.

3.2. CD97 Überexpression beeinflusst Signalwege in HT1080 Zellen - Verifizierung der Kinexus Daten

Mittels Western Blots wurden ausgewählte Proteine, deren Phosphorylierung im Multi-Immunoblot™ von Kinexus in TM7 im Vergleich zu TM2 und mock reguliert war, hinsichtlich Gesamtexpression und Phosphorylierung verifiziert. Im Kinexus Multi-Immunoblot™ wurden hauptsächlich Proteine aus Signalwegen der Apoptose, des Zellzyklus und der Zellproliferation untersucht. Da durch CD97 in HT1080 die Zellmigration gesteigert wird (vgl. Kapitel 3.3.), sollen auch solche Proteine mittels Western Blot untersucht werden, die klassisch an der Regulation von Migration beteiligt sind. Der Western Blot wurde durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse aus mindestens drei voneinander unabhängigen Präparationen der mock, TM2 und TM7 Zellen wurden nach Abgleich auf mock gemittelt. Sie sind für die einzelnen Proteine neben einem typischen Western Blot nachfolgend parallel graphisch dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt nach Zugehörigkeit der Proteine zu einem Signalweg. Eine Übersicht über alle Ergebnisse liefert die Heat Map der Abbildung 3.2.1.

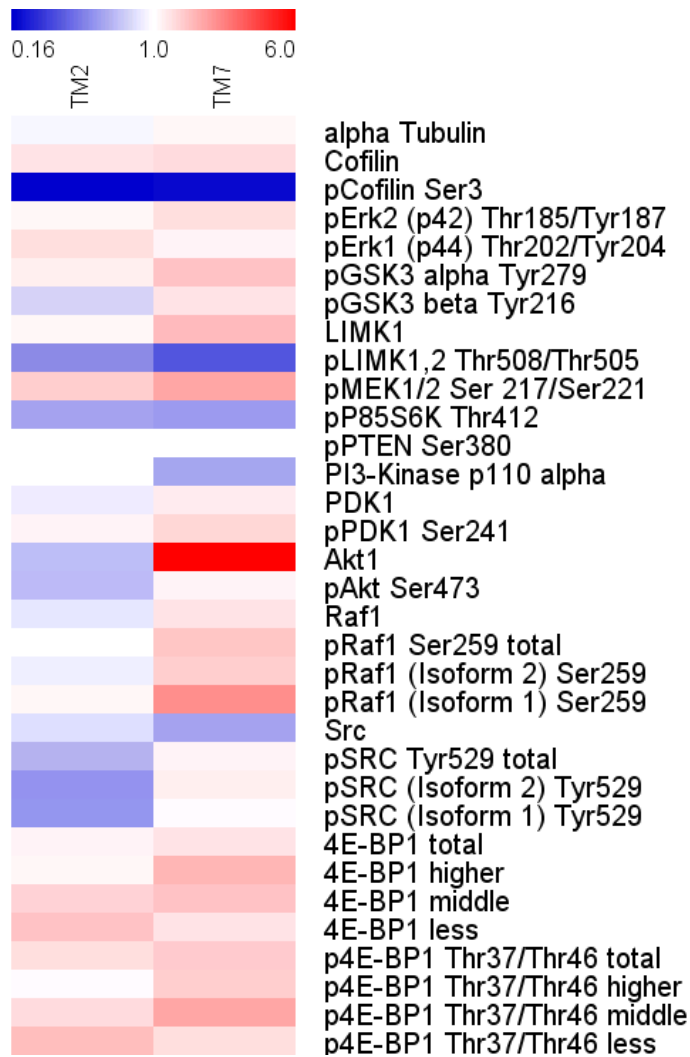
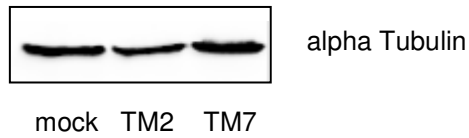
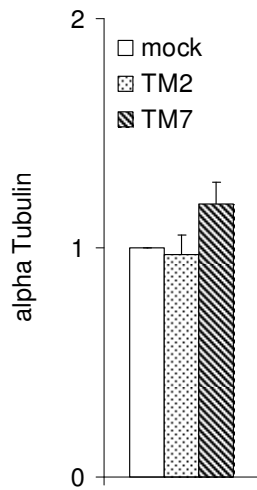


Abb. 3.2.1 Heat Map der Proteinexpression und Proteinphosphorylierung in den HT1080 Zellen. Für mindestens drei Ansätze, aus gleicher Proteinmenge (1mg/ml), wurden die Proteinexpression oder -phosphorylierung im Western Blot untersucht. Die Ergebnisse wurden gegen mock ins Verhältnis gesetzt, gemittelt und gegeneinander abgetragen. Daher gilt für mock = 1, hier liegt die Mitte der verwendeten Skalierung. (1= weiß = keine Änderung zu mock). Die größte Änderung im Vergleich zu mock beträgt 6,0, daher ist 6,0 als Maximalwert der Skalierung mit der Farbe Rot festgelegt. Das Maximum der Verringerung ist das Reziproke von 6,0 und bildet das Minimum der Skalierung mit 0,16 Farbe Blau.

alpha Tubulin



A



B

Abb. 3.2.2 Quantifizierung von alpha Tubulin mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen

A repräsentativer WB

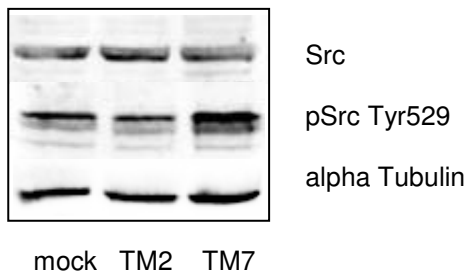
B Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert ± SEM;

* $p < 0,1$

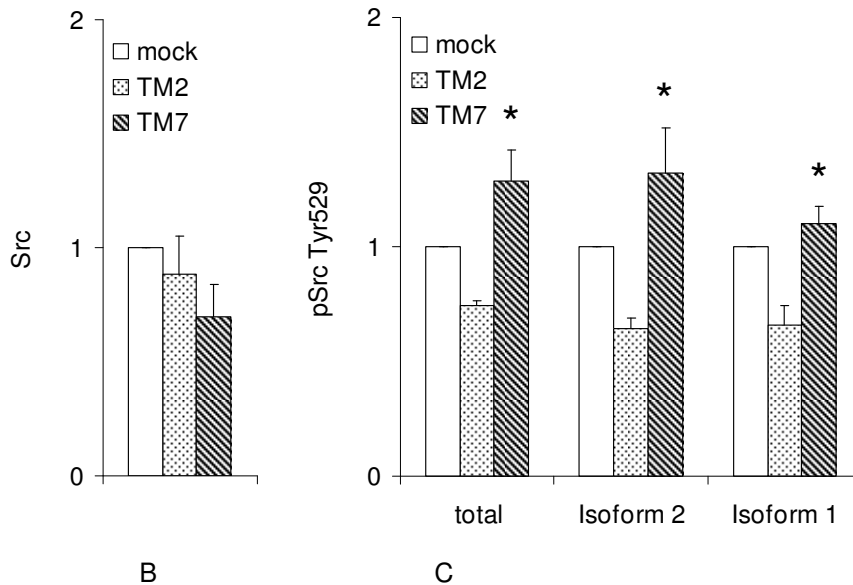
Alpha Tubulin, als Bestandteil der Mikrotubuli, ist wichtig für Migration von Zellen [49] und wurde daher hinsichtlich der Expression untersucht.

Die Expression von alpha Tubulin ist tendenziell gleich in TM7, TM2 und mock. Da keine signifikante Regulation von alpha Tubulin nachweisbar ist, wird es als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen im Western Blot verwendet und ist in den nachfolgenden Abbildungen jeweils dargestellt.

Src



A



B

C

Abb. 3.2.3 Quantifizierung von Src und pSrc mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen
A repräsentativer WB

Die obere Bande von pSrc Tyr⁵²⁹ zeigt Isoform 2, die untere Isoform 1.

B, C Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert ± SEM; * p < 0,1

Die Gesamtexpression von Src ist in TM7 tendenziell niedriger als in TM2 und mock. Der Antikörper gegen pSrc Tyr⁵²⁹ detektiert zwei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, wobei Isoform 1 das geringere Molekulargewicht hat und daher die untere Bande im WB darstellt. Insgesamt ist Src, aber auch jede der beiden Src-Isoformen separat betrachtet, an Tyr⁵²⁹ in TM7 im Vergleich zu TM2 und mock stärker phosphoryliert. In TM2 ist pSrc Tyr⁵²⁹ im Vergleich zu mock tendenziell gesenkt. Die Phosphorylierung an Tyr⁵²⁹ führt zur Inaktivierung von Src.

PI3-Kinase/Akt-Signalweg

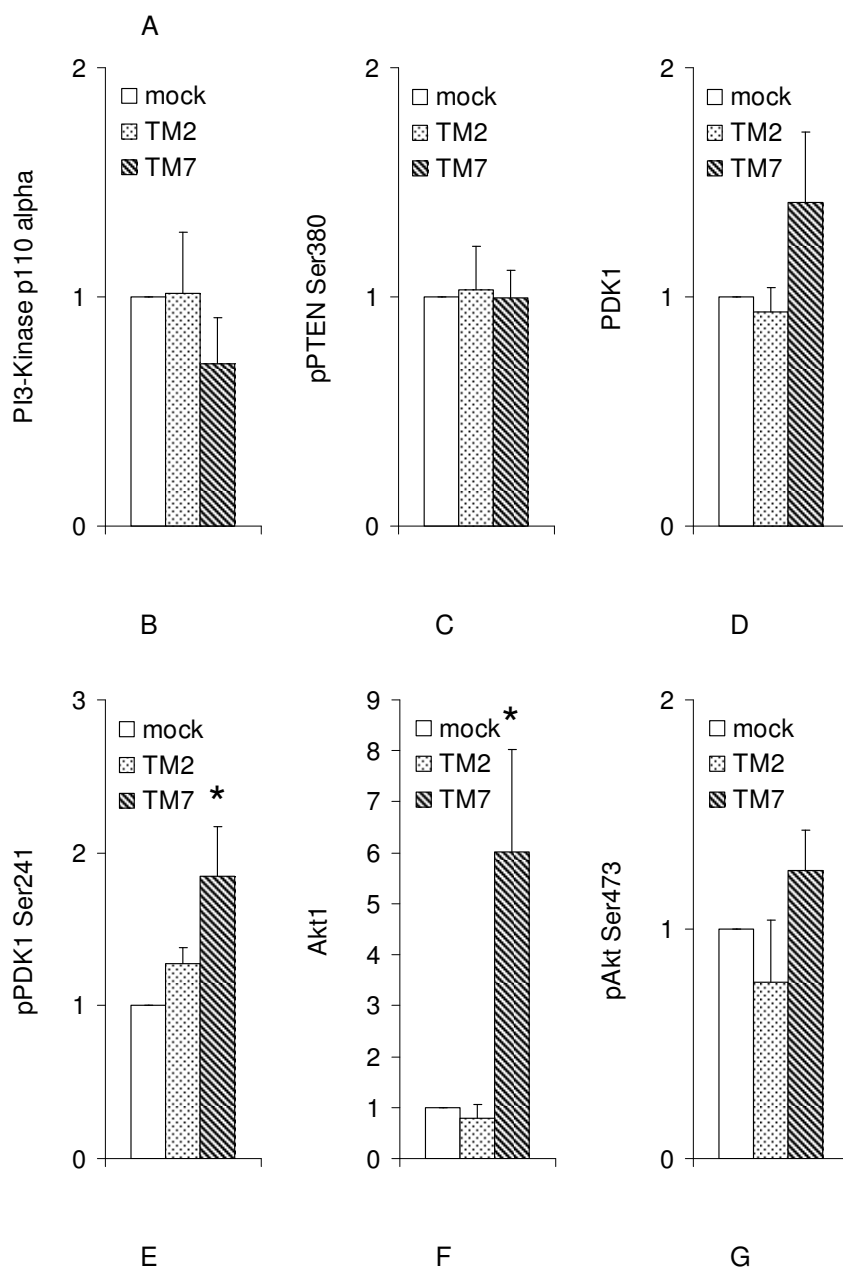
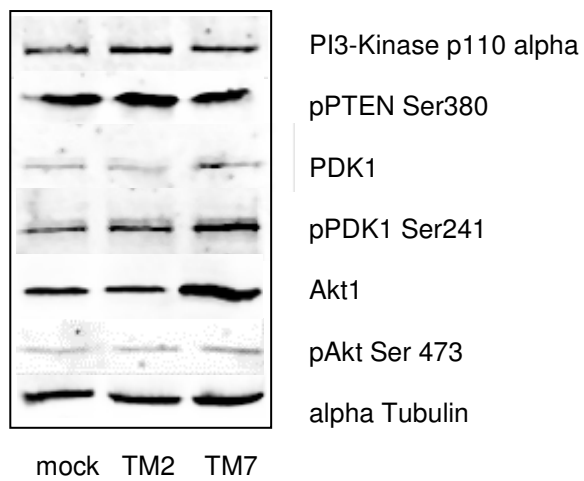


Abb. 3.2.4 Quantifizierung von PI3-Kinase p110 alpha, pPTEN, PDK1, pPDK1, Akt1 und pAkt mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen

A repräsentativer WB

B, C, D, E, F, G Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,1$

Viele der im Kinexus Multi-Immunoblot™ regulierten Proteine werden durch den PI3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert. Die PI3-Kinase/Akt-Signalwegmitglieder wurden daher im Western Blot untersucht und hier gemeinsam dargestellt. Eine Aktivierung von PI3-Kinase und PDK1, bei Inaktivierung von PTEN, führt zur Aktivierung von Akt1. Phosphorylierung aktiviert PI3-Kinase, PDK1, Akt1 und führt zur Inaktivierung von PTEN [50].

TM7 steigert die Expression von Akt1 im Vergleich zu TM2 und mock um ca. das 6-fache. Diese Steigerung der Gesamtexpression ist die stärkste unter den beobachteten Veränderungen. Akt Ser⁴⁷³ ist in TM7 tendenziell stärker phosphoryliert als in TM2 und mock. Akt Thr³⁰⁸ konnte nicht detektiert werden. Akt und pAkt Ser⁴⁷³ sind in TM2 im Vergleich zu mock tendenziell gesenkt. TM7 steigert tendenziell die Gesamtexpression von PDK1 verglichen mit TM2 und mock. PDK1 Ser²⁴¹ wird stärker in TM7 phosphoryliert als in TM2 und mock. TM7 senkt tendenziell die Expression von PI3-Kinase p110 alpha im Vergleich zu TM2 und mock. In TM7, TM2 und mock ist pPTEN Ser³⁸⁰ gleich stark phosphoryliert.

Erk-Signalweg

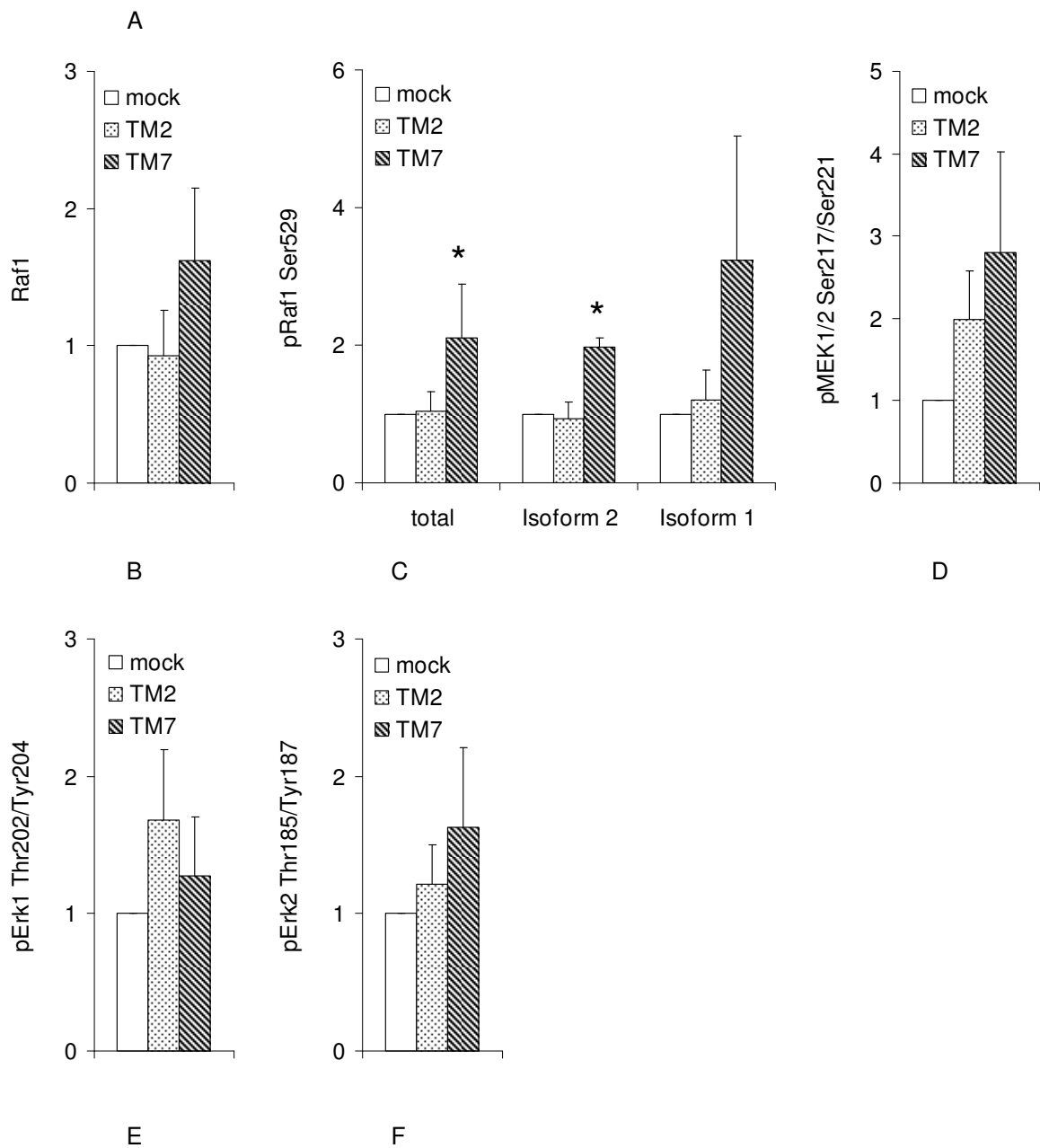
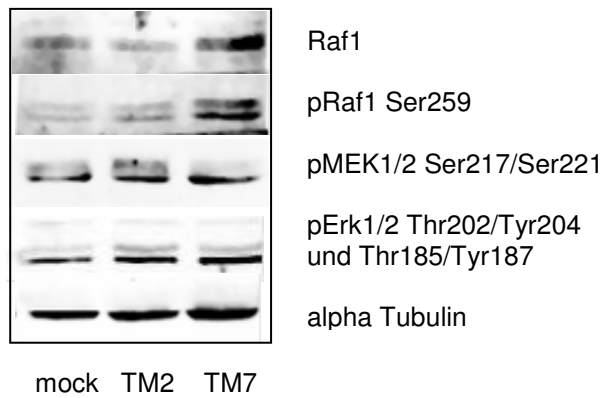


Abb. 3.2.5 Quantifizierung von Raf1, pRaf1, pMEK1/2 und Erk1/2 mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen

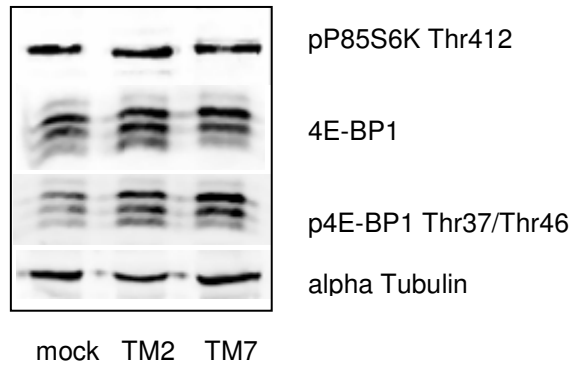
A repräsentativer WB

Die obere Bande von Erk1/2 zeigt dabei pErk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, die untere pErk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷. Die obere Bande pRaf Ser²⁵⁹ zeigt Isoform 2, die untere Isoform 1.

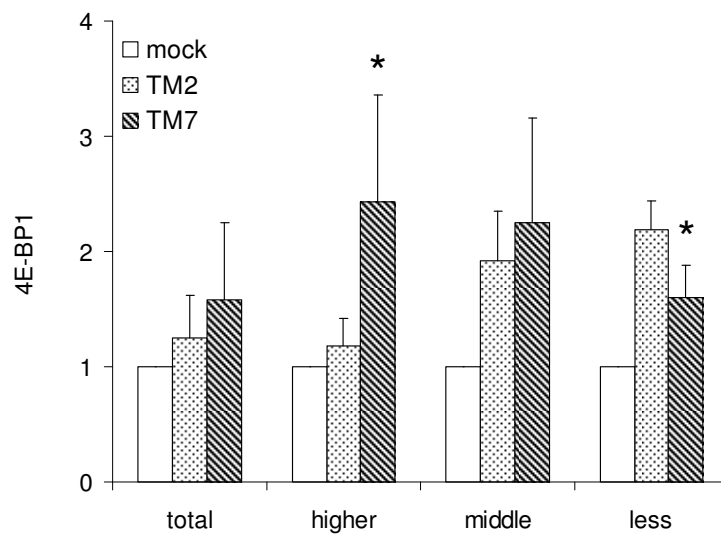
B, C, D, E, F Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,1$

Raf1, MEK1/2 und Erk1/2 sind nacheinander aktivierte Proteine des Erk-Signalweges [51] und daher gemeinsam dargestellt. Die Gesamtexpression von Raf1 ist in TM7 tendenziell höher als in TM2 und mock. Es existieren zwei Isoformen von Raf1, die durch den verwendeten Antikörper gegen pRaf1 Ser²⁵⁹ zu detektieren sind. Isoform 1 hat das geringere Molekulargewicht und ist daher durch die untere Bande im WB dargestellt. Total pRaf1 Ser²⁵⁹, aber auch Isoform 1 und 2 jeweils für sich, sind in TM7 stärker phosphoryliert als in TM2 und mock. Die Phosphorylierung an Ser²⁵⁹ führt zur Inaktivierung von Raf1. MEK1/2 Ser²¹⁷/Ser²²¹ ist in TM7 tendenziell stärker phosphoryliert als in TM2 und mock. Erk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ ist in TM7 tendenziell weniger phosphoryliert als in TM2, aber stärker als in mock. Erk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ ist in TM7 tendenziell stärker phosphoryliert als in TM2 und mock. Im WB zeigt die obere Bande pErk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, die untere pErk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷. Phosphorylierung an den untersuchten Aminosäuren führt zur Aktivierung von MEK1/2 und Erk1/2. In HT1080 mock, TM2 und TM7 konnte keine Phosphorylierung an MAPKAPK2 Thr³³⁴ gefunden werden (keine Abbildung).

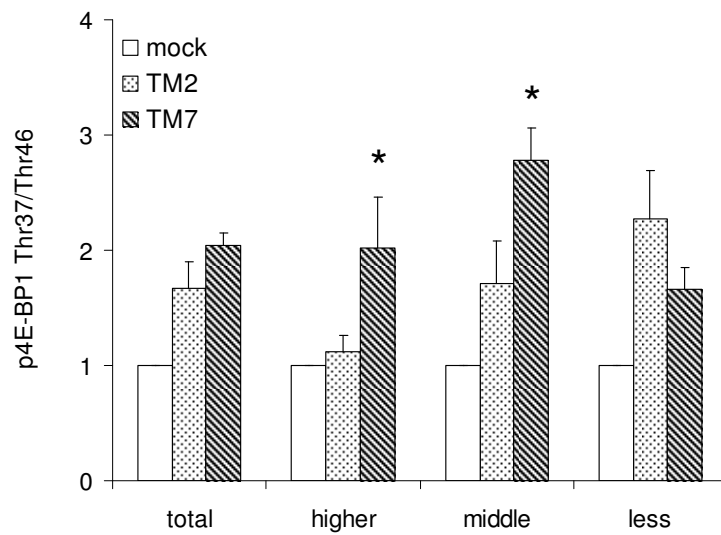
mTOR- Signalweg



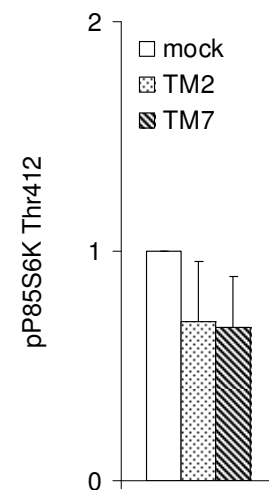
A



B



C



D

Abb. 3.2.6 Quantifizierung von 4E-BP1, p4E-BP1 und pP85S6K mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen
A repräsentativer WB

B, C, D Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,1$

4E-BP1, P70S6K und P85S6K sind Effektorproteine des mTOR-Signalweges [52] und wurden hinsichtlich ihrer Expression und Phosphorylierung untersucht.

Die verwendeten Antikörper detektieren drei charakteristische Banden von 4E-BP1 und p4E-BP1. Je stärker die Phosphorylierung an 4E-BP1, desto größer ist das Molekulargewicht, desto langsamer erfolgt die Wanderung im Gel des Western Blots. Die Bezeichnung der Banden erfolgt wie in der Literatur mit „higher“, „middle“, „less“, wobei „higher“ das hyperphosphorylierte 4E-BP1 darstellt, welches das größte Molekulargewicht aufweist [53].

TM7 steigert tendenziell die Gesamtmenge von 4E-BP1 und die Phosphorylierung an Thr³⁷/Thr⁴⁶ im Vergleich zu TM2 und mock. Das gering phosphorylierte p4E-BP1 Thr³⁷/Thr⁴⁶ less ist in TM7 tendenziell gesenkt im Vergleich zu TM2. Die mehrfach phosphorylierten p4E-BP1 Thr³⁷/Thr⁴⁶ middle und higher sind in TM7 gesteigert im Vergleich zu TM2. CD97 scheint die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr³⁷/Thr⁴⁶ also zu steigern. Diese Hyperphosphorylierung an 4E-BP1 führt zur Inaktivierung. In TM7 wird 4E-BP1 also stärker inaktiviert. P85S6K ist in TM7 und TM2 gleich stark an Thr⁴¹² phosphoryliert, tendenziell weniger verglichen mit mock. Phosphorylierung an Thr⁴¹² aktiviert P85S6K. Mit dem verwendeten Antikörper konnte die Phosphorylierung an P70S6K Thr³⁸⁹ im Western Blot nicht bestätigt werden.

GSK3

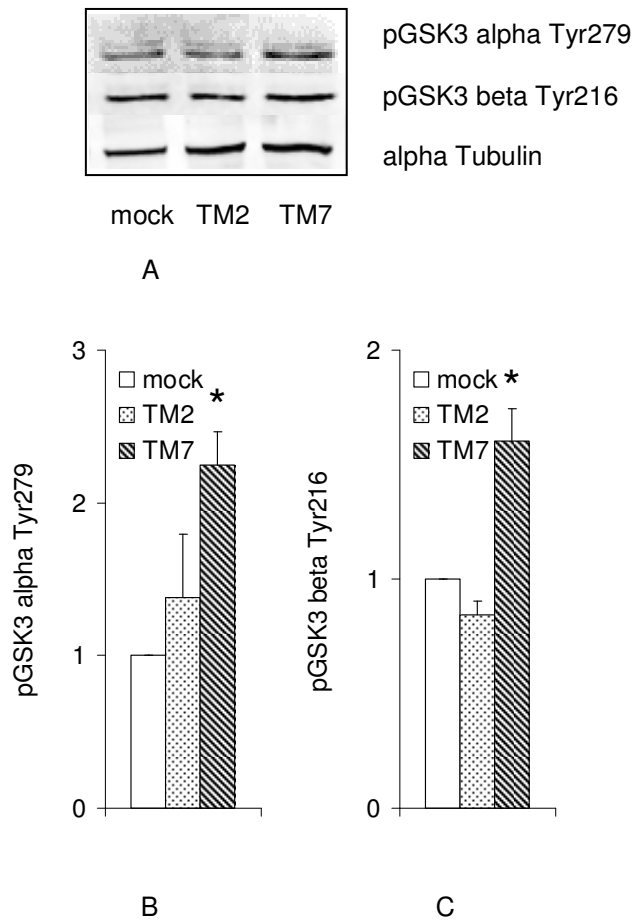


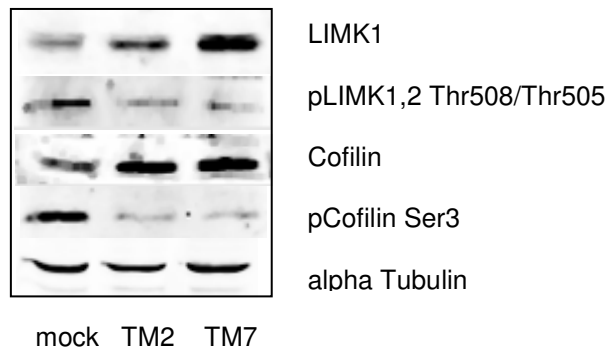
Abb. 3.2.7 Quantifizierung von pGSK3 alpha und pGSK3 beta mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen

A repräsentativer WB

B, C Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,1$

GSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und GSK3 beta Tyr²¹⁶ sind in TM7 stärker phosphoryliert im Vergleich zu TM2 und mock. Diese Phosphorylierungen wirken aktivierend. In TM2 ist pGSK3 beta Tyr²¹⁶ tendenziell gesenkt. In HT1080 mock, TM2 und TM7 ist GSK3 beta nicht an Ser⁹ phosphoryliert (keine Abbildung), bei Ser⁹ handelt es sich um eine inhibitorisch wirkende Phosphorylierung.

LIMK, Cofilin



A

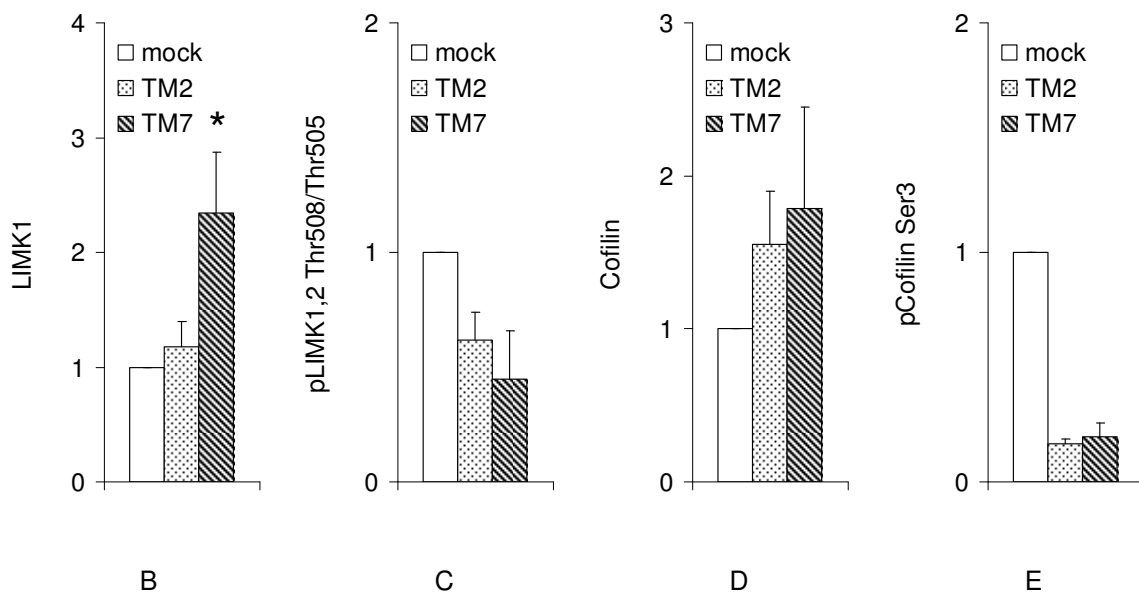


Abb. 3.2.8 Quantifizierung von LIMK1, pLIMK1,2, Cofilin und pCofilin mittels WB in HT1080 mock, TM2 und TM7 Zellen

A repräsentativer WB

B, C, D, E Auswertung der WB (n=3) mittels Image Studio Software 1.0.4 LiCor und Excel, Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,1$

Phosphorylierte, aktivierte LIMK1/2 Thr⁵⁰⁸/Thr⁵⁰⁵ phosphoryliert und inaktiviert Cofilin Ser³. Beide Proteine können so die Migration steuern [54]. Daher wurden sie hinsichtlich Expression und Phosphorylierung untersucht und die Ergebnisse sind gemeinsam dargestellt. TM7 steigert die Gesamtexpression von LIMK1 im Vergleich zu TM2 und mock. LIMK1,2 Thr⁵⁰⁸/Thr⁵⁰⁵ ist in TM7 tendenziell weniger phosphoryliert als in TM2 und mock. TM7 steigert tendenziell die Expression von Cofilin im Vergleich zu TM2 und mock. Die Phosphorylierung von Cofilin Ser³ ist in TM7 und TM2 etwa gleich, aber tendenziell weniger als in mock.

3.3. CD97 reguliert 2D-Migration

3.3.1. CD97 steigert 2D-Einzelzellmigration

Um den Einfluss von CD97 auf die 2D-Migration in HT1080 zu untersuchen, wurde die 2D-Einzelzellmigration bestimmt, so wie in Material und Methoden beschrieben. Einen Überblick über die ermittelten Werte für den Migrationskoeffizienten D in mock, TM2 und TM7 liefert Tabelle 3.2.

Migrationskoeffizient D in $\mu\text{m}^2/\text{h}$			
	mock	TM2	TM7
Kontrolle	15.79	13.62	28.18
Wortmannin	12.21	12.63	15.17
Akt Inhibitor IV	13.57	13.06	20.65
SU6656	16.14	21.73	32.33

Tab. 3.2 Übersicht zum Migrationskoeffizienten D in HT1080 mit und ohne Einfluss von spezifischen Inhibitoren

TM7 steigert den Migrationskoeffizienten signifikant im Vergleich zu TM2 und mock (+ 52% zu TM2, + 44% zu mock, $p < 0,001$). Der Migrationskoeffizient ist in TM2 signifikant gesenkt im Vergleich zu mock (- 14% zu mock, $p < 0,01$). Für mock, TM2, und TM7 wurde der Migrationskoeffizient in Abbildungen 3.3.1 dargestellt.

Wortmannin senkt den Migrationskoeffizienten signifikant in TM7 und in mock (- 46% zu TM7, $p < 0,001$, - 23% zu mock, $p < 0,001$, jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor), keine signifikante Veränderung in TM2.

Akt Inhibitor IV senkt den Migrationskoeffizienten signifikant in TM7 und mock (- 27% zu TM7, $p < 0,001$, - 14% zu mock, $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor), keine signifikante Veränderung in TM2.

SU6656 steigert den Migrationskoeffizienten signifikant in TM7 und TM2 (+ 15% zu TM7, $p < 0,01$, + 60% zu TM2, $p < 0,001$, jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor), keine signifikante Veränderung in mock.

Der Einfluss der spezifischen Inhibitoren Akt Inhibitor IV, Src Inhibitor SU6656 und Wortmannin auf den Migrationskoeffizienten in HT1080 mock, TM2 und TM7 wurde in Abbildung 3.3.2 dargestellt.

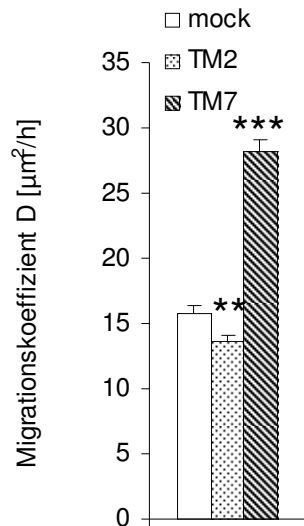


Abb. 3.3.1 Migrationskoeffizient D für mock, TM2 und TM7
Mittelwert ± SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01

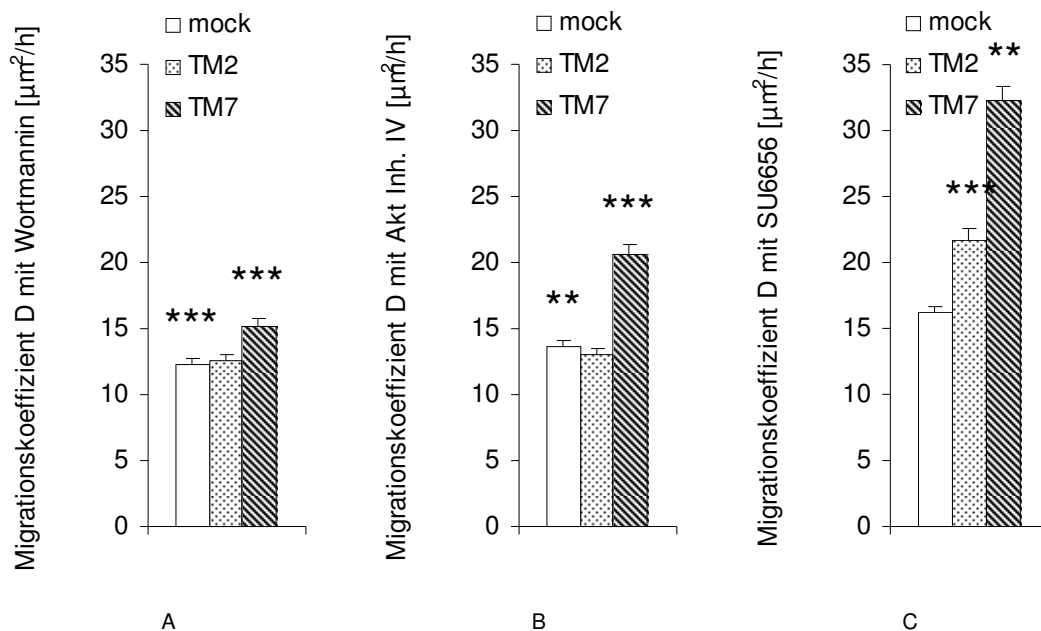


Abb. 3.3.2 Migrationskoeffizient D für mock, TM2 und TM7 mit spezifischem Inhibitor

A Wortmannin

B Akt Inhibitor IV

C SU6656

Mittelwert ± SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01

3.3.2. CD97 reguliert den Wundverschluss

Der Wundverschluss unter Verwendung eines Culture-Inserts wurde durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben. Dieser Versuchsansatz stellt ein weiteres Modell zur Untersuchung der 2D-Migration dar. Es wurde die prozentual verbleibende Wundfläche in Abhängigkeit der Zeit (alle drei Stunden) für mock, TM2 und TM7 bestimmt, wobei Zeitpunkt „Null“ das Entfernen des Culture-Inserts markiert. Abbildung 3.3.3 zeigt den prozentualen Anteil der Wundfläche der verschiedenen HT1080 Klone zum Zeitpunkt der jeweiligen Messung und Abbildung 3.3.4 einen repräsentativen Ausschnitt der Wundfläche 0h und 15h nach Entfernung des Culture-Inserts.

In **TM7** wird der Wundverschluss im Vergleich zu mock und TM2 beschleunigt. Nach 15h sind in TM7 nur noch 24%, bei mock 37% und bei TM2 50% Restwundfläche vorhanden. Der vollständige Wundverschluss ist in TM7 bereits zur Stunde 27 erfolgt, bei mock und TM2 geschieht dies erst zur Stunde 30.

Auf den Bildern der Abb. 3.3.4 wird die Beschleunigung des Wundverschlusses durch TM7 sichtbar. Zum Beginn der Beobachtung sind die Wundränder deutlich voneinander getrennt. Der Abstand ist für mock, TM2 und TM7 gleich ($500 \pm 50 \mu\text{m}$). Nach 15h ist der Wundbereich bei mock, TM2 und TM7 verkleinert, wobei der verbleibende Wundbereich in TM7 am kleinsten ist. Die Wundränder sind nach 15h noch voneinander getrennt. Der Wundverschluss wird durch Vorschub der Zellen an der Migrationsfront erreicht. Dieser resultiert aus der 2D-Migration der Zellen in den Wundbereich hinein, aber auch durch Proliferation der Zellen innerhalb der Wundränder. Apoptose findet innerhalb dieses Versuchsaufbaues ebenfalls statt. In den hier durchgeführten Versuchen bildeten sich keine Zellbrücken, wie sie für den Wundverschluss in Fibroblasten von Green et al. beschrieben wurden [39].

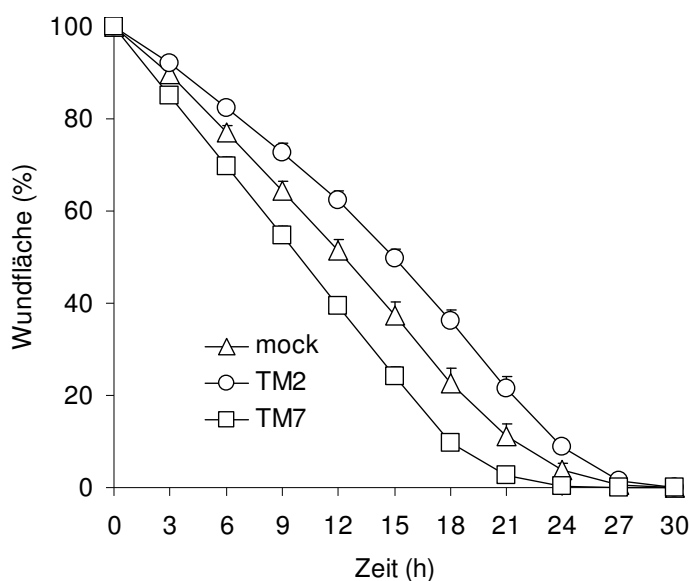


Abb. 3.3.3 Wundverschluss in HT1080 für mock, TM2 und TM7 Zellen über 30h
Auswertung der verbleibenden Wundfläche in % (n=3) alle drei Stunden, Mittelwert \pm SEM

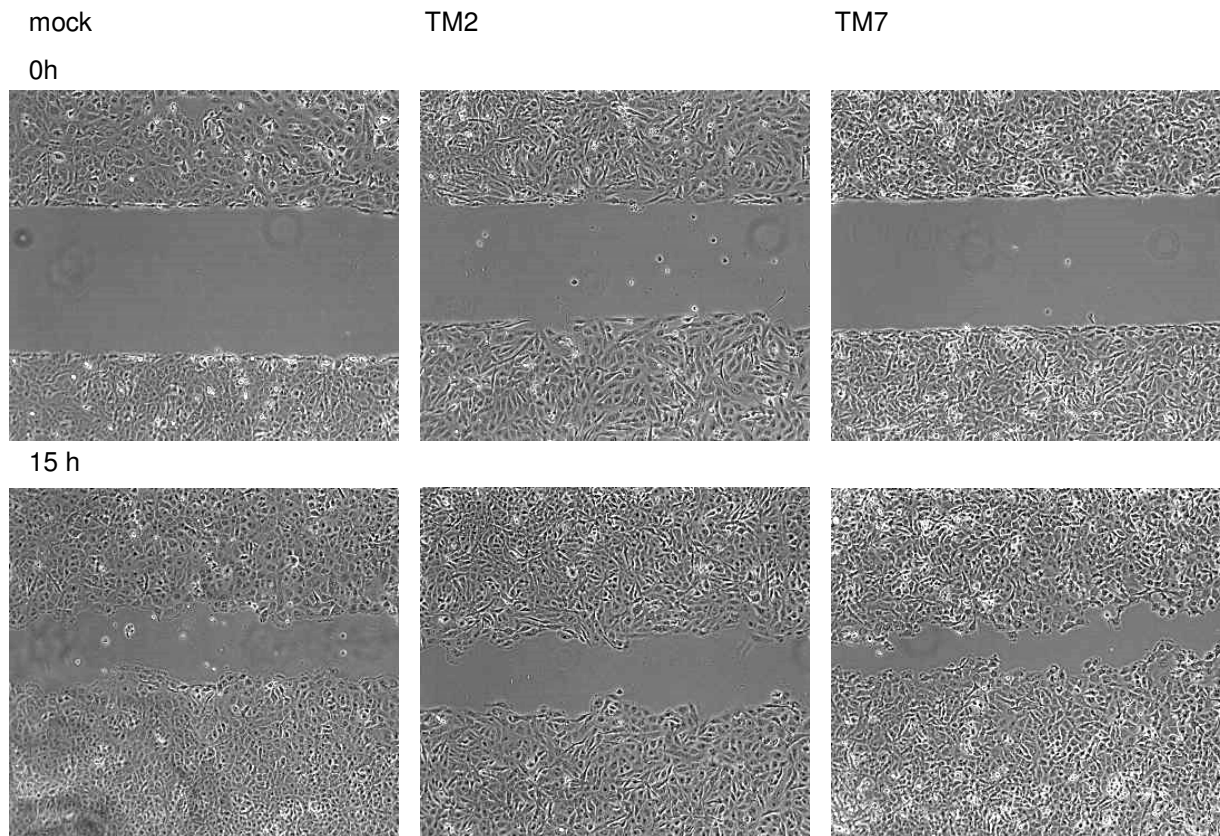


Abb. 3.3.4 Repräsentativer Ausschnitt einer Wundfläche 0h und 15h nach Entfernen des Culture-Inserts für mock, TM2 und TM7

Der Wundverschluss erfolgt durch 2D-Migration der Zellen in den Wundbereich und durch Proliferation der Zellen innerhalb der Wundränder. Zellbrücken zwischen den Wundrändern wurden nicht beobachtet.

Abbildung 3.3.5 zeigt den Einfluss spezifischer Inhibitoren auf den Wundverschluss.

Y-27632 beschleunigt als einziger Inhibitor den Wundverschluss in mock, TM2 und TM7. Die Wunde ist in mock bereits nach 24h vollständig verschlossen (Kontrolle 30h), in TM2 nach 27h (Kontrolle 30h) und in TM7 nach 18h (Kontrolle 27h). In TM7 wird der Wundverschluss am stärksten beschleunigt, die Wunde ist 9h eher als in der Kontrolle vollständig verschlossen. In TM2 wird der Wundverschluss am geringsten beschleunigt. Die Wunde ist in TM2 3h eher als in der Kontrolle verschlossen, in mock 6h eher als in der Kontrolle.

ML-7 verzögert den Wundverschluss in mock, TM2 und TM7 am stärksten im Vergleich zu den anderen Inhibitoren (- 7% in mock, - 21% in TM2 und - 26% in TM7 verglichen mit der Wundfläche der jeweiligen Kontrolle zur Stunde 15). Nach 30h sind 1% der Wundfläche in mock, 40% in TM2 und 14% in TM7 nicht verschlossen. In mock wird der Wundverschluss durch ML-7 am geringsten verzögert. Die größte Wundfläche verbleibt nach 30h in TM2. Nach 15h war allerdings in TM7 der Wundverschluss am stärksten verzögert. In TM2 wird der Wundverschluss nach der Stunde 15 also stärker verzögert als in TM7, sodass in TM2 mehr Wundfläche nach 30h verbleibt als in TM7.

Wortmannin führt zu einer Verzögerung des Wundverschlusses in mock, TM2 und TM7 (- 13% in mock, - 4% in TM2 und - 11% in TM7 verglichen mit der Wundfläche der jeweiligen Kontrolle zur Stunde 15). In mock wird der Wundverschluss am stärksten verzögert, in TM2 am wenigsten. Die 2D-Einzelzellmigration wurde durch Wortmannin in mock und TM7 verlangsamt, dabei am stärksten in TM7. In TM2 war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu finden. Die Wirkung von Wortmannin ist in beiden Versuchen zur 2D-Migration folglich gleichgerichtet.

Akt Inhibitor IV verzögert den Wundverschluss in mock am stärksten (- 16% in mock verglichen mit der Wundfläche der Kontrolle zur Stunde 15). In TM2 und TM7 wird der Wundverschluss erst nach 15h verlangsamt, bis zu diesem Zeitpunkt ist der Verlauf ähnlich zur jeweiligen Kontrolle. Nach 30h sind 8% Wundfläche in TM2 und 2% in TM7 nicht verschlossen, in mock 12% Wundfläche. Akt Inhibitor IV verlangsamt die 2D-Einzelzellmigration signifikant in mock und TM7, die Wirkung ist also in beiden Versuchen grundsätzlich gleichgerichtet.

SU6656 führt zu einer Verzögerung des Wundverschlusses in mock, TM2 und TM7 (- 17% in mock, - 12% in TM2 und - 8% in TM7 verglichen mit der Wundfläche der jeweiligen Kontrolle zur Stunde 15). Nach 27h ist die Wunde in TM7 vollständig verschlossen, so wie in der Kontrolle. In mock sind nach 30h 8% Wundfläche nicht vollständig verschlossen und in TM2 11%. SU6656 verzögert den Wundverschluss am geringsten in TM7, stärker dagegen in mock und TM2. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu dem der 2D-Einzelzellmigration. Dort führte SU6656 zur Steigerung des Migrationskoeffizienten in TM2 und TM7.

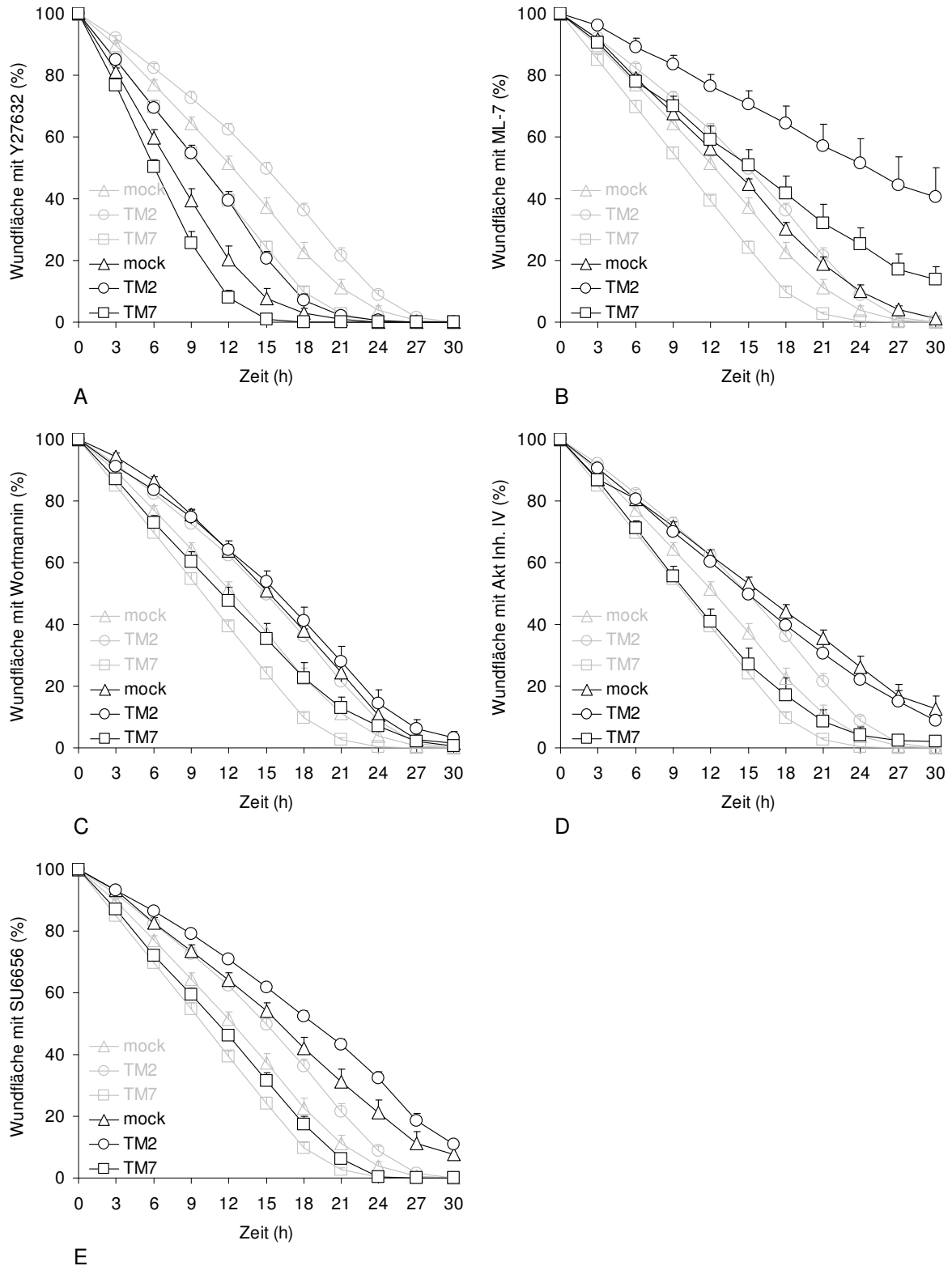


Abb. 3.3.5 Wundverschluss in HT1080 für mock, TM2 und TM7 mit spezifischen Inhibitoren über 30h
Auswertung der verbleibenden Wundfläche in % (n=3) mit dem spezifischen Inhibitor alle drei
Stunden, Mittelwert \pm SEM, dargestellt in schwarz.

Zur besseren Vergleichbarkeit ist die Wundfläche der Kontrolle in hellem Grau dargestellt.

A Y27632

B ML-7

C Wortmannin

D Akt Inhibitor IV

E SU6656

4. Diskussion

Teil A: Methodendiskussion

Zur Identifikation der durch CD97 regulierten Signalwege wurden Proteine hinsichtlich ihrer Phosphorylierung zunächst in einem für 37 Phosphorylierungsstellen optimierten Western Blot als Multi-Immunoblot™ von Kinexus quantifiziert. Diese und weitere klassisch an Migration beteiligte Proteine wurden in weiteren einfachen Western Blots hinsichtlich Expression und Phosphorylierung verifiziert. Durch Migrations- und Wundverschlussversuche unter dem Einfluss von spezifischen Inhibitoren wurde geklärt, ob der PI3-Kinase/Akt-Signalweg sowie Src an der Regulation der CD97-induzierten Steigerung der 2D-Migration beteiligt sind.

Multi-Immunoblot™ und Western Blot

Der zuerst durchgeführte Multi-Immunoblot™ von Kinexus lieferte einen Überblick über die regulierten Signalwege, da die Daten nur an einer einzelnen Stichprobe erhoben wurden. Die Ergebnisse für die interessantesten Proteine wurden anschließend im Western Blot in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen bestätigt. Aufgrund der geringen Stichprobengröße im Western Blot wurde ein statistisches Verfahren mit einer regularisierten, also geschätzten Varianz genutzt, wobei sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% ergab. Um eine quantitative Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen, muss sichergestellt sein, dass im Western Blot gleiche Mengen aufgetragen werden. Daher wurde vor Aussaat der Zellen die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt. Nach Herstellung des Lysates wurde die Proteinmenge mittels BCA-Bestimmung ermittelt und anschließend auf gleiche Proteinmengen eingestellt. Weiterhin wurde alpha-Tubulin als Ladekontrolle im Western Blot verwendet. Es ist Bestandteil der Mikrotubuli und kommt nachweislich in den transfektierten Zelllinien (mock, TM2 und TM7) in gleicher Menge vor. Durch diese Maßnahmen sollen Fehlerquellen möglichst minimiert werden und die Versuchsbedingungen möglichst identisch sein.

Die Proteinphosphorylierung ist ein Regulationsmechanismus, der relativ instabil ist, da Phosphatasen zur Dephosphorylierung der Proteine führen. Um Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad von Proteinen ziehen zu können, ist es aber wichtig, diese Phosphorylierungen nachzuweisen. Aus diesem Grund muss die Präparation der Zellen immer auf Eis erfolgen, die Dauer bis zum Lysieren ist kurz zu halten. Dazu erfolgt die Zentrifugation nach Gewinnung des Zellpellets bei 4°C, das Pellet wird auf Eis gelagert und schnell mit eiskaltem Puffer lysiert. Dadurch soll ein Verlust der Proteinphosphorylierung verhindert werden. Dem Lysepuffer werden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugefügt, um einen Proteinabbau und eine Dephosphorylierung zu minimieren.

Zellkultur

CD97 wird von hämatopoetischen Zellen exprimiert [17]. Aber auch auf Karzinomzellen und hier besonders auf kolorektalen Karzinomzellen, Magen-, Ösophagus- und Pankreaskarzinomen, sowie undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen [19, 21, 23]. Bei HT1080 handelt es sich um eine mesenchymale Tumorzelllinie.

Es sind keine Zellen, die histopathologisch den Karzinomen ähnlich sind, für die eine starke CD97-Expression beschrieben ist. HT1080 exprimieren aber endogen CD97. Die hier als Kontrolle

verwendeten mock Zellen enthalten also CD97, in vergleichbarer Menge wie Wildtypzellen, allerdings in geringerer Menge als in CD97/TM7. Gefundene Effekte in HT1080 sind daher in der Überexpression von CD97 begründet. Bei der mesenchymalen Tumorzelllinie HT1080 handelt sich um eine gängige Modelzelllinie, deren Eigenschaften von verschiedenen Arbeitsgruppen gut untersucht sind. Aufgrund ihrer Eigenschaft gut als vereinzelte Zellen zu migrieren, werden sie in dieser Arbeit verwendet.

Die Signaltransduktion der klassischen GPCR erfolgt typischerweise nachdem sie durch einen extrazellulären Stimulus (z.B. EGF) aktiviert wurden. Es kommt zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, die intrazelluläre Signalweiterleitung wird initiiert. Es wurden verschiedene Liganden identifiziert, die mit der extrazellulären Region vom CD97 interagieren können. Bisher wurde aber kein Ligand identifiziert, der zur direkten Aktivierung vom CD97 führt [2]. In den hier durchgeführten Versuchen wurde daher ohne spezifischen Stimulus zur Aktivierung der CD97-Rezeptorfunktion gearbeitet. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem FKS-Medium, sodass verschiedene, nicht genau zu charakterisierende und daher unspezifische Wachstumsfaktoren im Nährmedium vorhanden waren. Die Überexpression von CD97 in den HT1080 Zellen ist nicht unbegrenzt stabil. Aufgrund der Co-Transfektion mit zwei Vektoren kann es in den Zellen dazu kommen, dass sie einen der beiden Vektoren verlieren. Der pBI-Vektor (mit einkloniertem CD97) enthält keine Antibiotikaresistenz zur Selektion von eukaryotischen Zellen, im Vektor pWE-4 ist dagegen eine Resistenz gegen Hygromycin enthalten. Verliert die Zelle also lediglich ihren pBI-Vektor, ist eine Resistenz gegen Hygromycin vorhanden, sodass sie weiter kultiviert wird, obwohl sie über keine CD97-Überexpression mehr verfügt. Daher wurden regelmäßig flowzytometrische Kontrollen durchgeführt und nur die Klone verwendet, bei denen mehr als 90% der Zellen CD97 stabil überexprimieren. Zusätzlich wurden Reklonierungen durchgeführt, die zu einer stabileren Expression von CD97 führten. Dazu wurden Einzelzellen in 96er Well ausgesät und nach Bildung einer größeren Zellkolonie ebenfalls flowzytometrische Kontrollen auf CD97 Expression durchgeführt. Bei ausreichender Anzahl von CD97 exprimierenden Zellen (> 90%), wurde die Zellkolonie weiter verwendet. Negative Klone oder bei zu geringer CD97 Expression wurden die Zellen verworfen. Nach einer solchen Reklonierung erwiesen sich die Klone als recht stabil.

Die HT1080 werden bei 37°C und 5% CO₂ Anteil in der Luft inkubiert. Schwankungen der äußeren Bedingungen müssen vermieden werden

2D-Migration

Das Modell zur Bestimmung des Migrationskoeffizienten ist ein zweidimensionales (2D) Modell. *In vivo* migrieren Tumorzellen allerdings dreidimensional (3D) durch bestehende Gewebestrukturen und degradieren dabei die ECM [37]. Das genutzte 2D-Modell ist in der Literatur anerkannt und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den grundlegenden Einfluss von CD97 auf die Einzelzellmigration der HT1080 zu untersuchen. Dabei bleibt die Degradation der ECM durch sezernierte Proteasen, die ebenfalls durch CD97 beeinflusst sein könnten, unberücksichtigt. Leider konnte die Einzelzellmigration nicht kontinuierlich mittels „Lifetime Imaging“ verfolgt werden, die notwendige Gerätekonfiguration war nicht vorhanden. Daher wurden drei und 16 Stunden nach der Aussaat der mock, TM2 oder TM7 stabil überexprimierenden HT1080 Zellen Fotos eines definierten

Ausschnittes gemacht und für mindestens 20 Zellen die x- und y- Koordinaten zu beiden Zeitpunkten bestimmt. Der Zeitpunkt des ersten Bildes war so gewählt, dass die Zellen am Untergrund adhärent waren. Dies ist ca. drei Stunden nach Aussaat der Fall. Der Zeitpunkt für das zweite Bild der Bilderserie wurde vor der ersten Zellteilung gewählt, demnach 16 Stunden nach Aussaat. Es war schwierig, alle Zellen des Bilderpaares exakt zu identifizieren. Insbesondere bei schnell migrierenden Einzelzellen kann so eine Identifizierung schwierig werden und das Endergebnis in Folge als zu gering ermittelt werden.

Bei allen Bildpaaren wurden daher die Einzelergebnisse nochmals überprüft um Ausreißer zu eliminieren. Zellen wurden nicht berücksichtigt, wenn eine Zuordnung der Einzelzelle nach 16 Stunden nicht genau möglich war. Durch diesen Fehler würden sich sonst Migrationskoeffizienten ergeben, die deutlich oberhalb der tatsächlichen Werte liegen. Aufgrund der hohen Stichprobenzahl von mindestens 20 Zellen je Bild und 3 Versuchsansätzen mit jeweils 5 Bilderpaaren wurde versucht, die beschriebenen Fehlerquellen so gering wie möglich zu halten.

Wundverschluss

Im 2D-Wundverschluss wird quantifiziert, wie schnell Zellen nach einer „Verletzung“ einer konfluenten Zellkultur die freie Fläche wieder verschließen können. Er reflektiert sowohl die Migration als auch die Proliferation von Zellen und ist daher nicht geeignet, einen dieser beiden Prozesse isoliert zu betrachten. Weiterhin interagieren die Zellen über die bestehenden Zell-Zell-Kontakte, dies beeinflusst ebenfalls die Geschwindigkeit des Wundverschlusses. Demnach ist der Wundverschluss kein klassischer Migrationsversuch.

In den Wundverschlussversuchen wurde ein Culture-Insert verwendet, welches eine definiert große Wundfläche bildet und bei dessen Verwendung die Abstände der Wundränder zueinander an jeder Stelle gleich sind. Die Wunde wird nicht in eine bestehende adhärente Zelllage gesetzt. Die mechanische Barriere, die durch das Insert entsteht, verhindert, dass die Zellen eine vollständige Zelllage bilden können. Nach Entfernen des Culture-Insert ergab sich der Wundspalt. Es bestanden also nicht zu allen Seiten Zellkontakte, sondern auch Kontakt zu dem Material des Culture-Inserts. Aufgrund der fehlenden Zellkontakte zu allen Seiten der Zelle ist der hier durchgeführte Wundverschluss nicht der natürlich entstehenden Wunde gleichzusetzen. Aufgrund der definierten und gerade verlaufenden Wundränder ist in diesem Fall allerdings das Migrationsverhalten von Einzelzellen besser zu beurteilen. Die Zelldichte ist vor dem Entfernen des Culture-Insert mikroskopisch zu überprüfen um sicherzustellen, dass der Wundverschluss nicht durch zusätzliche Freiräume innerhalb der Zelllage verfälscht wird. Die Zellen sollen demzufolge gleichmäßig konfluent wachsen.

4.1. CD97 reguliert Effektorproteine in HT1080

Die Phosphorylierung von Effektormolekülen durch Kinasen ist wichtig für die Regulation von zellulären Prozessen. Einen Überblick über die Phosphorylierung wichtiger Schlüsselproteine der intrazellulären Signalkaskade bei Überexpression von CD97 haben wir mit dem optimierten Western Blot von Kinexus (Multi-Immunoblot™) erhalten. Die Ergebnisse wurden anschließend in Western Blots verifiziert und erweitert. Im Folgenden werden die Signalwege diskutiert, die durch die Überexpression von CD97 in HT1080 Zellen reguliert werden. Schwerpunkte liegen dabei in der Beschreibung der Regulation von Migration, Apoptose, Zellproliferation und Zellzyklus. Schaubilder zur Veranschaulichung der Signalwege sind stark vereinfacht. Einen beispielhaften Überblick über die Regulation der Signalwege in vivo und die Interaktion verschiedener Signalmoleküle untereinander liefern die Abbildungen in der Anlage 4 (PI3-Kinase/Akt-Signalweg, Src- und Erk- Signalweg).

4.1.1. CD97 reguliert Signalwege der Zellmigration

4.1.1.1. CD97-Überexpression steigert die Phosphorylierungen zahlreicher Effektorproteine des PI3-Kinase/Akt-Signalweges und aktiviert Akt-Expression

PI3-Kinase/Akt-Signalweg

Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche vor allem Wachstumsfaktor-induzierte Signale und Stresssignale (oxidativer Stress) vermittelt. Akt ist in die Regulation der Karzinomprogression, Metabolismus, Zellwachstum und -differenzierung, sowie Zellüberleben involviert. Es existieren drei Isoformen von Akt in Säugetieren (1, 2, 3). Deren Funktion ist abhängig vom Gewebe, dem Stimulus, der angestrebten Funktion und dem zellulären Milieu. Durch extrazelluläre Signale wird die PI3-Kinase aktiviert, es steigt der PIP3-Spiegel in den Zellen an. Akt wird an die Zellmembran rekrutiert, es folgt die Kolokalisation von PDK. PDK1 wird aktiviert, anschließend Akt an Threonin phosphoryliert. Serin kann durch zahlreiche weitere Kinasen, wie z.B. mTOR oder durch Autophosphorylierung phosphoryliert werden. Für Akt1 sind das Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸. Nur durch Phosphorylierung beider Aminosäuren erreicht Akt seine volle Kinaseaktivität. PTEN ist in der Lage den PIP3-Spiegel zu senken und damit inhibierend auf den PI3-Kinase/Akt-Signalweg zu wirken, pPTEN Ser³⁸⁰ ist inaktiviert [50, 55].

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg wird häufig in Karzinomzellen aktiviert. Akt spielt eine wichtige Rolle in der Regulation invasiver Zellmigration, es reguliert Aktinorganisation, Zell-Zell-Adhäsion, Zellbeweglichkeit und Degradierung der ECM [56]. In HT1080 wird die PI3-Kinase durch konstitutive Sekretion von PDGF dauerhaft aktiviert. Es resultiert ein konstitutiv aktives Akt [32]. Eine Überexpression von Akt steigert die Migration in HT1080 Zellen auf das Doppelte, von konstitutiv aktivem Akt auf das Dreifache. Diese Migrationssteigerung ist von einer regelhaften Akt-Kinaseaktivität abhängig. Akt wird dabei an der Membran, am sogenannten „leading edge“ lokalisiert, diese Lokalisation ist von der Anwesenheit der PI3-Kinase abhängig. Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg ist hier direkt an der Regulation der Migration beteiligt. MMP-9 Sekretion wird dabei erhöht [57, 58]. Im

Mausmodell konnte eine Expressionssteigerung von Akt und ein Anstieg von pAkt Ser⁴⁷³ durch CD97 gezeigt werden [28].

Aktiviertes Akt1 reguliert dann nachfolgende Signalproteine. Es führt zum Beispiel zur Phosphorylierung von CREB, sowie P70S6K, P85S6K und 4E-BP1 via mTOR und inhibiert den Erk-Signalweg durch Phosphorylierung von Raf1 [51, 91, 101, 102], siehe Abbildung 4.1.1. Aus diesen Gründen wurden Proteine des PI3-Kinase/Akt-Signalweges auf Expression und Phosphorylierung untersucht.

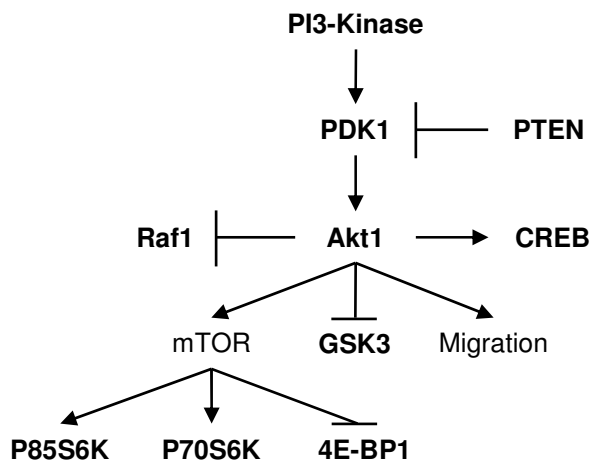


Abb. 4.1.1 PI3-Kinase/Akt-Signalweg

Akt1 reguliert als wichtige Serin/Threoninkinase zahlreiche Zellfunktionen und beeinflusst andere Signalwege. Weiterhin steigert Akt1 die Migration von Zellen.

In der Abbildung sind die untersuchten Proteine „fett“ markiert, während die nicht markierten ausschließlich zur Erklärung des Signalweges dienen. Diese Art der Darstellung wird in den folgenden Abbildungen übernommen.

Kinexus: In den untersuchten HT1080 Zellen konnte keine Phosphorylierung von Akt1 an Thr³⁰⁸ oder Ser⁴⁷³ ermittelt werden.

WB: TM7 steigert die Expression von Akt1 und tendenziell die Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ im Vergleich zu TM2 und mock, in TM2 wird beides tendenziell gesenkt. An Akt Thr³⁰⁸ wurde keine Phosphorylierung in HT1080 Zellen gefunden. TM7 steigert tendenziell die Gesamtexpression von PDK1 und die Phosphorylierung an Ser²⁴¹ verglichen mit TM2 und mock. TM7 senkt tendenziell die Expression von PI3-Kinase p110 alpha im Vergleich zu TM2 und mock.

Weiterhin wurde in einem einmalig durchgeführten Western Blot untersucht, ob Unterschiede in der Expression von PI3-Kinase p85, PI3-Kinase p110 beta und Kinase Class III nachweisbar sind. Es zeigten sich keine tendenziellen Unterschiede (keine Abbildung gezeigt), daher wurden die Expression dieser Proteinuntereinheiten nicht weiter untersucht. Für PI3-Kinase p85 /p55 konnte keine Phosphorylierung und für PI3-Kinase p110 gamma keine Expression in HT1080 gefunden werden. In TM7, TM2 und mock ist pPTEN Ser³⁸⁰ gleich stark phosphoryliert.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse auf eine stärkere Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges durch CD97 hin, dies ist in Abbildung 4.1.2 dargestellt. Viele Proteine, die Mitglieder des PI3-Kinase/Akt-Signalweges sind, Akt-Aktivierung herbeiführen können und damit auf Akt-Aktivierung hinweisen, zeigten gesteigerte Phosphorylierungen in HT1080 CD97 verglichen mit mock und TM2. In

den HT1080 CD97 war Akt1-Expression und tendenziell pAkt Ser⁴⁷³ gesteigert. Diese Ergebnisse passen zu denen der Arbeitsgruppe Prof. Aust. In einem Mausmodell mit induzierter CD97-Expression wurden eine Expressionssteigerung von Akt und Steigerung von pAkt Ser⁴⁷³, d.h. eine Akt-Aktivierung nachgewiesen [28]. CD97 aktiviert den PI3-Kinase/Akt-Signalweg stärker als mock, durch TM2 scheint dieser Signalweg interessanterweise in der Aktivierung gesenkt zu werden. Es zeigte sich eine verminderte Expression von Akt1 und PDK in TM2 verglichen mit mock. Auch pAkt Ser⁴⁷³ war tendenziell in TM2 geringer als in mock. Dies deutet eine unerwartete Wirkungsweise des CD97/TM2 an. Das auf TM2 verkürzte CD97-Konstrukt könnte als Kompetitor wirken und die endogene CD97-Wirkung in den HT1080 supprimieren. In den Kontrollzellen mock wird endogen CD97 exprimiert, es zeigt die endogene CD97-Wirkung (vergleichbar einer Wildtyp-Expression).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Signalweiterleitung von CD97 die vollständige TM7-Region und der intrazelluläre Abschnitt nötig sind.

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg wird in HT1080 konstitutiv aktiviert [32]. Ob eine de novo Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges durch CD97 vorliegt oder es sich um eine zusätzliche Aktivierung des bereits vorhandenen aktiven Signalweges handelt, ist daher aus den hier durchgeführten Versuchen nicht eindeutig abzuleiten. Offen bleibt auch, an welcher Stelle des PI3-Kinase/Akt-Signalweg CD97 regulierend eingreift und ob eine direkte Interaktion mit einem Mitglied dieses Signalweges vorliegt. CD97 ist ein transmembranäres Molekül, eine direkte Interaktion mit der PI3-Kinase wäre also möglich. Dieses Protein ist im Signalweg oberhalb von PDK1 und Akt1 lokalisiert [56, 59]. Andererseits war die Expression von PI3-Kinase p110 α in TM7 tendenziell vermindert im Vergleich zu TM2 und mock. Eine Aktivierung durch CD97 wäre aber dennoch möglich, da die Gesamtexpression keine verlässliche Schlussfolgerung über die bestehende Kinaseaktivität zulässt. Co-Immunopräzipitationen könnten Hinweise liefern, ob Akt1, PI3-Kinase oder andere identifizierte Proteine direkt mit CD97 interagieren.

Kim et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von Akt die Migration von HT1080 auf das Doppelte erhöht, Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante sogar auf das Dreifache. Diese Ergebnisse waren stark abhängig von der Akt-Kinaseaktivität und der Fähigkeit zur Membrantranslokation [57]. In HT1080 könnte also durch CD97-Überexpression die Migration via PI3-Kinase/ Akt-Signalweg gesteigert werden. Daher sollen Migrationsversuche mit spezifischen Inhibitoren für Akt durchgeführt werden, um einen solchen Zusammenhang zu untersuchen. Unklar ist, ob eine Expressionssteigerung von Akt1 durch CD97 allein ausreichend sein kann, eine Migrationssteigerung in HT1080 zu bewirken oder eine Aktivierung von Akt dafür essentiell ist. Neben Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ existieren weitere Akt-Phosphorylierungsstellen, über die bisher nur wenig bekannt ist. Diese könnten im Western Blot analysiert werden, um zu prüfen, ob sie durch CD97 reguliert werden. Eine Messung der Akt-Kinaseaktivität könnte Hinweise geben, ob Expressionssteigerung oder Akt-Aktivierung durch CD97 induziert wird.

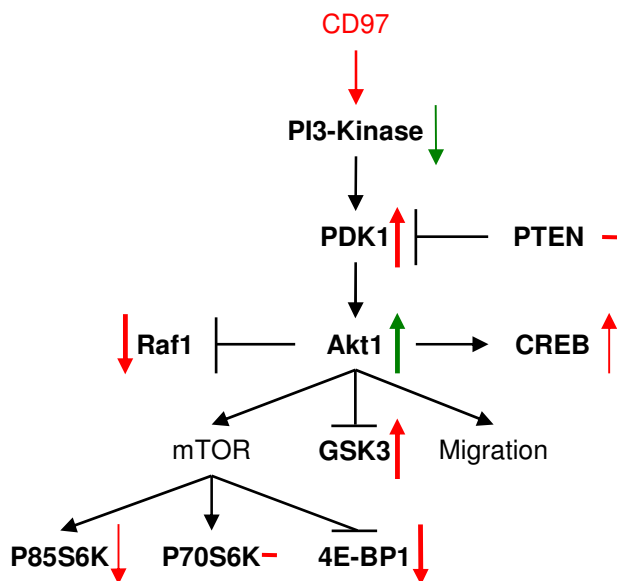


Abb. 4.1.2 CD97 aktiviert den PI3-Kinase/Akt-Signalweg

In der Abbildung sind die durch CD97 verursachten Regulationen der Proteinkinaseaktivität, die aus der gemessenen Phosphorylierung des Proteins abgeleitet wurden, in roter Farbe dargestellt. Alleinige Veränderungen der Proteinexpression in grüner Farbe. Dabei deuten „dünne“ Pfeile eine Tendenz an, während „dicke“ Pfeile signifikante Ergebnisse anzeigen. Pfeile nach oben zeigen eine Steigerung der Kinaseaktivität des Proteins, Pfeile nach unten eine Verringerung. Diese Art der Darstellung wird in den folgenden Abbildungen übernommen.

Da für Akt1 eine Steigerung der Expression um ca. das 6-fache im Vergleich zu mock und TM2 ermittelt wurde, wohingegen tendenziell nur eine leichte Steigerung von pAkt Ser⁴⁷³ nachgewiesen werden konnte, ist in dieser Abbildung nur die Expressionssteigerung markiert.

STAT3 → Akt1 Expression

Aktives v-Src vermittelt Zellüberlebenssignale durch eine gesteigerte Expression von Akt1 auf mRNA- und Proteinebene direkt durch Aktivierung von STAT3. Im Promotor des Akt1-Genes befinden sich Bindungsstellen für STAT3 [60], siehe Abbildung 4.1.3.

Phosphorylierung an Ser⁷²⁷ durch RhoA, Rac1 und Cdc42 ist für die Aktivierung der STAT3 Kinase Aktivität nötig. Auf diese Weise können Signale, die Migration und Zellproliferation steigern, weiter geleitet werden [61].



Abb. 4.1.3 STAT3 fördert Akt1-Expression

Kinexus: TM7 steigert pSTAT3 Ser⁷²⁷ im Vergleich zu TM2 und mock. Durch TM7 wird pSrc Tyr⁵²⁹ gesteigert, das Protein damit gehemmt (vgl. Kapitel 4.1.1.2.). Src liegt in der Signalübertragung oberhalb von STAT3. Eine Src-unabhängige Aktivierung von STAT3 durch CD97 wäre möglich und könnte zur gesteigerten Akt1-Expression führen.

WB: TM7 steigert Akt1-Expression

Zusammenfassend wird die Expressionsteigerung von Akt1 durch CD97 wahrscheinlich via STAT3 vermittelt. Dies ist in Abbildung 4.1.4 dargestellt.

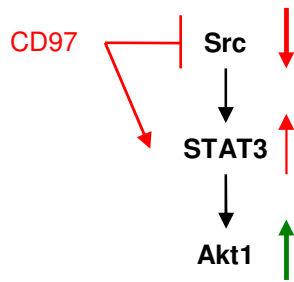


Abb. 4.1.4 CD97 steigert Akt1-Expression auf Proteinebene

GSK3

GSK3 ist an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt, beispielsweise am Glukosemetabolismus, an Entzündungsreaktionen, Apoptose, Migration und Zellzyklus. Sie spielt eine Rolle bei der Entstehung von Alzheimer, Diabetes und Karzinomen. Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg führt zu Phosphorylierung an GSK3 alpha Ser²¹ oder GSK3 beta Ser⁹ und so zur Inaktivierung der Kinase [62], siehe Abb. 4.1.1. GSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und GSK3 beta Tyr²¹⁶ werden durch Autophosphorylierung phosphoryliert. Dadurch steigen die Proteinestabilität und die Kinaseaktivität [63].

Kinexus: TM7 steigert pGSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und pGSK3 beta Tyr²¹⁶ im Vergleich zu TM2 und mock. In HT1080 Zellen sind weder GSK3 alpha Ser²¹ noch GSK3 beta Ser⁹ phosphoryliert.

WB: TM7 steigert pGSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und pGSK3 beta Tyr²¹⁶ im Vergleich zu TM2 und mock dabei wird pGSK3 beta Tyr²¹⁶ tendenziell durch TM2 gesenkt. GSK3 beta ist in HT1080 nicht an Ser⁹ phosphoryliert.

Zusammenfassend spielt die Inaktivierung des Proteins via Akt1 hier keine Rolle, die Stabilität wird durch CD97-induzierte Steigerung der Autophosphorylierung erhöht, siehe Abb.4.1.2. Eine vermehrte Aktivität von GSK3 alpha und beta in CD97 ist wahrscheinlich. In TM2 gab es unterschiedliche Ergebnisse bei pGSK3 beta Tyr²¹⁶, im Kinexus war die Phosphorylierung ähnlich wie in mock. Im Western Blot zeigte sich tendenziell eine verminderte Phosphorylierung in TM2 im Vergleich zu mock, was auf eine reduzierte Kinaseaktivität schließen lassen würde.

Die hier gefundenen Ergebnisse widersprechen denen von Becker et al. Durch CD97-Expression im Mausmodell war eine Steigerung von pGSK3 beta Ser⁹ nachweisbar [28]. Diese inaktivierende Serinphosphorylierung konnte in der vorliegenden Arbeit so nicht bestätigt werden. Es ist daher möglich, dass die CD97-induzierte GSK3-Regulation vom Zelltyp und/oder unterschiedlichen Bedingungen *in vivo*- oder *in vitro*- abhängig ist.

4.1.1.2. CD97 inhibiert Src durch Phosphorylierung von Tyr⁵²⁹

pSrc → Migration

Src ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase ohne eigene Rezeptorfunktion, welche durch Membranrezeptoren aktiviert werden kann. Nach der Aktivierung stellt Src einen Startpunkt für verschiedene Signalkaskaden dar. Src steuert Zellüberleben, Mitogenese, Reorganisation des Zytoskeletts und Adhäsion der Zellen und dadurch Zellmigration und Invasion.

Tyrosinphosphorylierung der Focal Adhesion Kinase (FAK) rekrutiert und aktiviert Src. Es entsteht ein

stabiler FAK-Src-Komplex, in dem Src FAK an weiteren Tyrosinen phosphoryliert. Dadurch steigt die Kinaseaktivität von FAK, weitere Substrate zur Steuerung der Reorganisation des Aktinzytoskeletts werden gebunden und aktiviert. Weiterhin kann der PI3-Kinase/Akt-Signalweg durch Src aktiviert werden. Am „leading edge“ der Membran migrierender Zellen steuert der FAK-Src-Komplex den Auf- und Abbau von Adhäsionskontakten [64]. Es existieren zwei Isoformen von Src, die durch alternatives Spleißen entstehen [65]. Das Src-Proton-Onkogen codiert für zwei Transkriptionsvarianten (mRNA), wobei Variante 2 sich in der 5'UTR zu Variante 1 unterscheidet. Variante 1 und 2 kodieren für dasselbe Protein [66, 67]. Isoform 1 wurde als die anerkannte Sequenz etabliert. Isoform 2 unterscheidet sich zu Isoform 1 wie folgt: in 117 bei Isoform 1: Threonin (T), bei Isoform 2: Threonin-Arginin-Lysin-Valin-Asparaginsäure-Valin-Arginin (TRKVDVR). Isoform 1 ist die kürzere mit 59835 Da, Isoform 2 verfügt über 60589 Da [68].

Die Regulation von Src ist wahrscheinlich Zelltyp-abhängig und in der Literatur zum Teil widersprüchlich beschrieben. Daher sind hier verschiedene Erklärungsmodelle dargelegt.

Verminderte Src Aktivität kann Migration regulieren

Durch Inhibierung von Src und Calpain2 wird die mesenchymale Migration in HT1080 blockiert, nicht aber die amöboide [69]. Src Inhibierung durch Dasatinib in Melanomzellen führt sogar zur Transition von mesenchymaler zu amöboider Migrationsform [70]. In Schilddrüsenkarzinomzellen der Ratte wird durch Dephosphorylierung von Tyr⁵²⁹ Src aktiviert, FAK stärker phosphoryliert und so die Adhärenz der Zellen gesteigert. Durch pSrc Tyr⁵²⁹ wird dagegen die Adhärenz der Zellen vermindert [71], vergleiche dazu Abbildung 4.1.5.

Es gibt aber auch Hinweise, dass Src-Aktivierung Migration steigert:

FAK aktiviert Src durch Phosphorylierung an Tyr⁴¹⁸ innerhalb des aktiven Zentrums. Gleichzeitig muss Src an Tyr⁵²⁹ dephosphoryliert sein, damit es zu gesteigerter Motilität in Neuroblastomzellen kommen kann [72]. FAK wird durch Akt-abhängige Phosphorylierung aktiviert, dieser Vorgang wird durch Src vermittelt. Akt und FAK sind für eine Initiation der Invasion von kolorektalen Karzinomzellen unabdingbar [73].

Interessant ist aus diesem Grund, ob eine Regulation von Src durch CD97-Überexpression in HT1080 vorliegt.

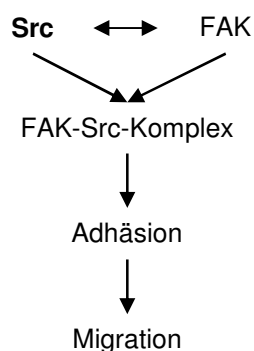


Abb. 4.1.5 Src reguliert Zellmigration auf unterschiedliche Weise (Erklärungsmodelle siehe Text)

Kinexus: In TM7 sind beide Isoformen von pSrc Tyr⁵²⁹ im Vergleich zu TM2 und mock stärker phosphoryliert. In HT1080 Zellen ist Src nicht an Tyr⁴¹⁸ phosphoryliert, damit nicht aktiviert.
 WB: Die Expression von Src ist in TM7 tendenziell niedriger im Vergleich zu TM2 und mock. Die beiden Isoformen von Src sind in TM7 stärker an Tyr⁵²⁹ phosphoryliert als in TM2 und mock. In TM2 ist pSrc Tyr⁵²⁹ am geringsten.

Zusammenfassend führt CD97 zu einer reduzierten Src Kinase Aktivität (siehe dazu Abbildung 4.1.6. und 4.1.8.) und könnte daher die Migration beeinflussen. In HT1080 könnte eine CD97-induzierte Steigerung der Migration durch Inhibierung von Src vermittelt werden. In Migrationsversuchen soll der Einfluss von Src durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren untersucht werden.

In TM2 ist pSrc Tyr⁵²⁹ am geringsten und damit stärker aktiviert als in TM7, hier zeigt sich ebenfalls die supprimierende Wirkung von CD97/TM2 auf die endogene CD97-Wirkung. Die CD97-induzierte PI3-Kinase/Akt-Signalweg- Aktivierung wird in HT1080 vermutlich nicht via Src reguliert.

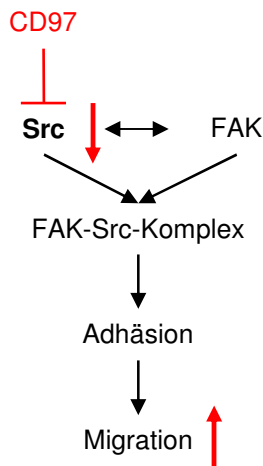


Abb. 4.1.6 CD97 inhibiert Src-Aktivität und könnte dadurch die Migration steigern

4.1.1.3. CD97 reguliert den Cofilin-Signalweg

LIMK1/2 → Cofilin

Cofilin reguliert Zellmigration durch Beschleunigung des Umbaus der zellulären Aktinfilamente. Cofilin wird durch aktivierte pLIMK1 Thr⁵⁰⁸ an Ser³ phosphoryliert und dadurch inaktiviert, durch SSH1L wieder dephosphoryliert und aktiviert. Obwohl LIMK1 Cofilin deaktiviert, wird LIMK bei Stimulation von Jurkat T Zellen vermehrt aktiviert und die gerichtete Migration dadurch gesteigert. Nur ein Zusammenspiel von LIMK1 und SSH1L in der Regulation von Cofilin führt so zu gerichteter Migration in stimulierten Jurkat T Zellen [54]. In Medikamenten-resistenten Osteosarkomzellen konnte gezeigt werden, dass allein die Überexpression von LIMK1 auf Proteinebene zu einer gesteigerten Migrationsrate und gesteigerter Phosphorylierung von Cofilin führt [74].

Inhibierung von Src durch Dasatinib führt in Melanomzellen zu ROCK-vermittelter amöboider Migrationsform [70]. In HT1080 Zellen wird durch ROCK-abhängige Aktivierung von LIMK die amöboide Migrationsform in einer 3D-Matrix gefördert, dabei wird die Phosphorylierung von Cofilin gesteigert. Aber auch die Überexpression von LIMK führt hier zu einer Zunahme der runden Zellmorphologie, ein Merkmal der amöboiden Migrationsform [75]. Das ist in Abbildung 4.1.7 dargestellt.

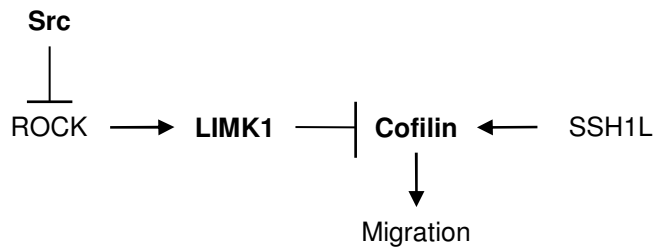


Abb. 4.1.7 SSH1L und LIMK1 regulieren Cofilin und dadurch Migration

WB: TM7 steigert LIMK1 und senkt gleichzeitig tendenziell die Phosphorylierung von LIMK1,2 Thr⁵⁰⁸/Thr⁵⁰⁵ im Vergleich zu TM2 und mock. TM7 steigert tendenziell Cofilin im Vergleich zu TM2 und mock. Dabei ist pCofilin Ser³ in TM7 und TM2 gleich, aber tendenziell weniger als in mock.

Zusammenfassend wird durch CD97 die Aktivität von LIMK1,2 herabgesetzt und die von Cofilin gesteigert. Der Antikörper gegen pLIMK detektiert die Phosphorylierung von LIMK1 und LIMK2. Die verringerte Phosphorylierung von Cofilin Ser³ bestätigt aber die reduzierte Kinaseaktivität von LIMK1, da diese für die Serinphorylierung verantwortlich ist. Die Expression von LIMK1 und tendenziell auch die von Cofilin sind gesteigert. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Migration in HT1080 durch LIMK1 und Cofilin reguliert und gesteigert werden. Denn wichtig für die Zellmigration ist ein geregeltes Zusammenspiel von LIMK1, SSH1L und Cofilin. Auch in den Jurkat T Zellen ist nur durch das Zusammenwirken der Proteine eine Regulation der Migration möglich [54]. Die vorliegenden Ergebnisse sind allerdings konträr zu den Ergebnissen von Mishima et al. Hier konnte bei 3D-Migrationsversuchen in HT1080 eine gesteigerte Aktivität der LIMK und verringerter Aktivität von Cofilin gezeigt werden. Das führte zu einer Förderung der amöboiden Migrationsform [75]. Ein Wechsel zwischen der mesenchymalen und amöboiden Migrationsform ist für HT1080 während der 3D-Migration beschrieben [38], lässt allein für sich aber keine verlässliche Aussage über die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen zu. Weiterhin sind diese Versuche 3D-Migrationsmodelle, es handelt sich also um einen anderen Versuchsaufbau als in der vorliegenden Arbeit, wo ausschließlich die Signaltransduktion während der 2D-Migration untersucht wurde. Es sind also zahlreiche Hinweise vorhanden, dass LIMK1 und Cofilin die CD97-induzierte Migrationssteigerung in HT1080 regulieren könnten. Der mögliche Einfluss von CD97 auf Cofilin und LIMK1 ist in Abbildung 4.1.8 dargestellt. Weitere Migrationsversuche sind nötig, um einen Einfluss des LIMK/Cofilin Signalweges auf die Migration nachzuweisen.

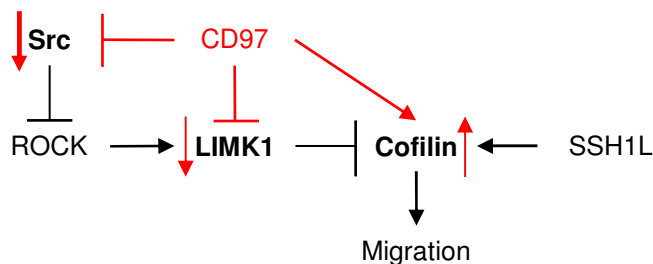


Abb. 4.1.8 CD97 steigert die Aktivität von Cofilin und so wahrscheinlich die Migration

4.1.1.4. PKC Isoformen werden durch CD97 beeinflusst

PKC delta → Migration

PKC delta steigert die Zellbeweglichkeit und Kontraktilität. Dabei wird es mit Adducin an der Membranprotrusion kolokalisiert und phosphoryliert Adducin an Ser⁷²⁶ [76]. Knockdown von PKC delta verhindert in Fibroblasten die LPA-induzierte Migration [77]. Die Funktion der Phosphorylierung von PKC delta an Thr⁵⁰⁷ ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich ist sie nicht zwingend für die Kinaseaktivität nötig [78]. Adducine sind Membranskelettproteinen, die aus der alpha-, beta- und gamma- Untereinheit zusammengesetzt werden. Sie rekrutieren Spectrin zu den schnell wachsenden Enden der Actin-Filamente. Diese Beobachtungen lassen eine Rolle von Adducinen bei der Zellmigration vermuten [79]. Adducin gamma reguliert beispielsweise die Ausbildung von zellulären Kontakten in Epithelzellen [80] und steuert Zellbewegung in embryonalen Huhnzellen [81]. Die genaue Funktion in HT1080 ist unbekannt. Schematisch ist die Wirkungsweise in Abbildung 4.1.9 dargestellt.

Kinexus: PKC delta Thr⁵⁰⁷ ist in HT1080 Zellen gering vorhanden. TM7 steigert pPKC delta Thr⁵⁰⁷ im Vergleich zu TM2 und mock. Die Phosphorylierung von Adducin alpha an Ser⁷²⁶ ist in TM7 und TM2 gesteigert verglichen mit mock. TM7 senkt pAdducin gamma Ser⁶⁹³ im Vergleich zu TM2, im Vergleich zu mock wird es durch TM7 gesteigert.

Zusammenfassend könnte durch CD97 eine Regulation der Migrationsgeschwindigkeit via pPKC delta Thr⁵⁰⁷ und pAdducin alpha Ser⁷²⁶ vermittelt werden. Die Steigerung von pAdducin alpha Ser⁷²⁶ in TM7 und TM2 zeigt, dass für diese Signaltransduktion die extrazelluläre EGF1,2,5 Domäne von CD97 verantwortlich oder die verkürzte Transmembranregion (TM2) ausreichend ist. Die vollständige TM7 Region mit intrazellulärem Abschnitt ist nicht zwingend nötig, um die Steigerung von pAdducin alpha Ser⁷²⁶ zu vermitteln. Dieses Ergebnis ist interessant, weil bei keinem anderen der untersuchten Proteine die Phosphorylierung in TM7 und TM2 gleichstark, aber stärker als in mock war. Die genaue Rolle von pAdducin gamma in den CD97-überexprimierenden HT1080 bleibt dagegen unklar, siehe auch Abb. 4.1.10.

PKC alpha und beta II

Durch Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), welches PKC alpha aktiviert, wird die Zellform von HT1080 Zellen verändert, aus fibroblastenartigen werden halbmondförmige. Gleichzeitig nimmt die Migration der Zellen zu. PKC alpha gelangt aus dem Zytosol an die Zellmembran [33]. Phosphorylierung an Thr⁶³⁸ schützt PKC alpha vor Phosphatasen und einer Inaktivierung der Kinaseaktivität [82]. Thr⁶³⁸, Ser⁶⁵⁷ und Thr⁶⁴¹ sind Autophosphorylierungsstellen von PKC alpha und beta II, die die Integrität des Proteins stabilisieren und die Translokation in subzelluläre Kompartimente regulieren. Die Dephosphorylierung erfolgt durch PP1 [83]. Abbildung 4.1.9 stellt den Signalweg schematisch dar.



Abb. 4.1.9 PKC Isoformen regulieren Migration

Kinexus: PKC alpha wird in HT1080 Zellen insgesamt stark phosphoryliert. TM7 senkt die Phosphorylierung von PKC alpha Ser⁶⁵⁷, aber auch von PKC alpha und beta II Thr⁶³⁸ / Thr⁶⁴¹ verglichen mit TM2 und mock.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine geringere Stabilität und Funktionalität der PKC alpha und beta II durch CD97 hin. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine geringere Bedeutung von PKC alpha und beta bei der Regulation der durch CD97-Überexpression induzierten Migrationssteigerung hin, siehe Abbildung 4.1.10.

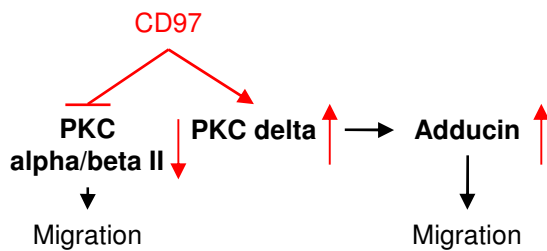


Abb. 4.1.10 CD97 könnte Migration via PKC delta und Adducin regulieren

4.1.2. Apoptose-regulierende Signalproteine

4.1.2.1. CD97 Überexpression reduziert Erk-Signalweg-Aktivierung

pRaf1 → pErk1/2

Durch Aktivierung des MAPK/Erk-Signalweges (MAPK, engl. Mitogen-activated protein kinase, typisch für diese Gruppe sind mehrstufige Signalwege), bei Inhibition des Akt-Signalweges, kann in HT1080 Zellen durch ionisierende Strahlung in Kombination mit Arsentrioxid eine gesteigerte Apoptose und Autophagie induziert werden [84, 51]. Als eines der Schlüsselproteine der Regulation des MAPK/Erk-Signalweges fungiert die Serin-Threonin Kinase Raf1, welche via MEK1/2 eine Aktivierung von Erk1/2 erreicht [51]. Es existieren zwei Isoformen von Raf1, wobei Isoform 1 als die anerkannte Sequenz etabliert wurde. Isoform 1, auch bekannt als 6C, hat ein Molekulargewicht von 73052 Da, was damit geringer als das von Isoform 2, auch 1A, mit 75395 Da ist. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer Sequenz an Aminosäure 278 [85].

Zur Aktivierung von Raf1 kommt es durch Phosphorylierung an Ser³⁴¹ durch Src oder an Ser³³⁸ durch Pak, ein Zielprotein der PI3-Kinase. Akt wirkt inhibitorisch auf Raf1 durch Phosphorylierung an Ser²⁵⁹ [51]. Aktives pRaf1 aktiviert MEK1/2 durch Phosphorylierung an Ser²¹⁸/Ser²²², ein Protein des MAPK/Erk-Signalweg. Anschließend phosphoryliert und aktiviert dieses Erk1 an Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, sowie Erk2 an Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ [86]. Deshalb ist die Phosphorylierung von Proteinen des MAPK/Erk-Signalweges in den HT1080 Zellen in Abhängigkeit vom exprimierten CD97-Konstrukt interessant. Der Erk-Signalweg ist in Abbildung 4.1.11 dargestellt.

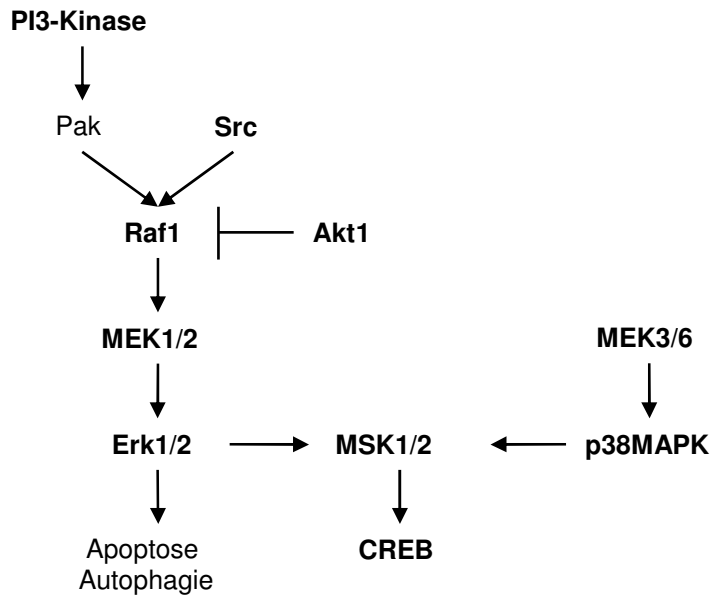


Abb. 4.1.11 Darstellung des Erk-Signalweges

Kinexus: In HT1080 Zellen wird durch TM7 pRaf1 Ser²⁵⁹ im Vergleich zu TM2 und mock gesteigert, dabei ist die Phosphorylierung in TM2 stärker als in mock. Die TM7-induzierte Steigerung ist an der Isoform 2 stärker nachweisbar als an Isoform 1. Da es sich bei pRaf1 Ser²⁵⁹ um eine inhibitorische Phosphorylierungsstelle handelt, wäre eine Reduzierung von pMEK1/2 und pErk1/2 in TM7 zu erwarten. Es zeigte sich jedoch durch TM7 eine Steigerung von pMEK1/2 Ser²¹⁸/Ser²²² im Vergleich zu TM2 und mock, wobei in TM2 die Phosphorylierung stärker als in mock ist. TM7 senkt pErk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ und pErk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ im Vergleich zu TM2 und mock. In TM2 waren pErk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ und pErk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ am stärksten phosphoryliert.

WB: TM7 steigert tendenziell die Expression von Raf1 und signifikant pRaf1 Ser²⁵⁹ verglichen mit TM2 und mock. Raf1 Isoform 1 ist tendenziell und Isoform 2 signifikant stärker an Ser²⁵⁹ phosphoryliert als in TM2 und mock. TM2 und mock zeigen ähnliche Expression und Phosphorylierung von Raf1. TM7 steigert tendenziell pMEK1/2 Ser²¹⁷/Ser²²¹ verglichen mit TM2 und mock. Die diesbezüglichen Kinexus-Ergebnisse konnten folglich bestätigt werden. Erk1 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ ist in TM7 tendenziell weniger phosphoryliert als in TM2, wobei es in mock am geringsten ist. Erk2 Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ ist in TM7 dagegen tendenziell stärker phosphoryliert als in TM2 und mock. MAPKAPK2 war nicht an Thr³³⁴ phosphoryliert.

Zusammenfassend deutet die gesteigerte Phosphorylierung an Ser²⁵⁹ auf eine Inhibition von Raf1 durch CD97, welches das zentral regulierte Protein des MAPK/Erk-Signalweges ist. Src wird durch CD97 ebenfalls gehemmt (vgl. Kap. 4.1.1.2.), sodass eine Aktivierung von Raf1 via Src, wie in der Literatur beschrieben [51], unwahrscheinlich ist. Gleichzeitig wird die Aktivität von MEK1/2 durch CD97 gesteigert, die Regulation von Erk1/2 ist widersprüchlich. Der MAPK/Erk-Signalweg ist an der Induktion von Apoptose beteiligt, daher könnte durch CD97 ein Schutz vor Apoptose bestehen, dies ist zu überprüfen. Der mögliche Einfluss von CD97 auf den Erk-Signalweg ist in Abbildung 4.1.12 dargestellt.

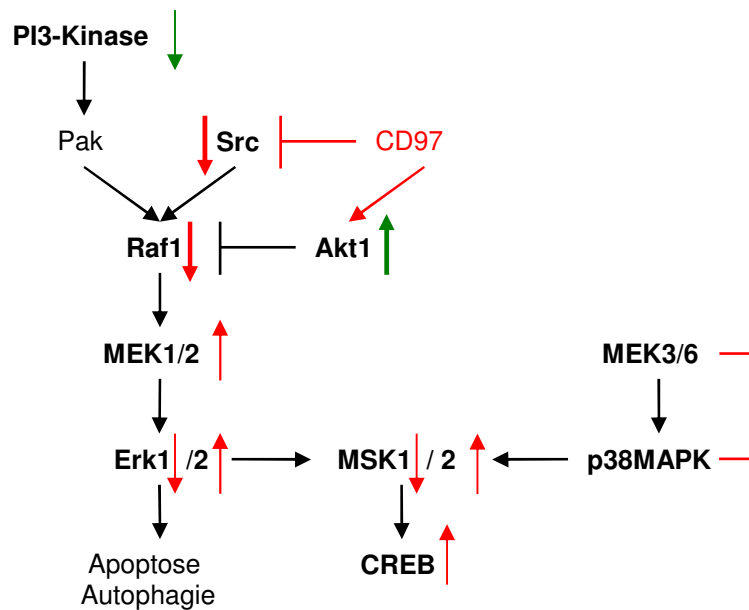


Abb. 4.1.12 CD97 führt durch vermehrte Aktivierung von Akt1 und Inhibierung von Src zu einer verminderten Aktivität von Raf1, es könnte über den Erk-Signalweg eine Regulation der Apoptose erfolgen.

pMsk1 → pCREB

Zur Gruppe der MAPK gehört auch die p38 MAPK, welche durch MEK3/6 aktiviert wird [87, 88]. Erk oder p38 MAPK phosphorylieren MSK1, ein Effektorprotein des MAPK/Erk-Signalweges, an Ser³⁶⁰ und Thr⁵⁸¹ und aktivieren es. Für die katalytische Aktivität ist außerdem die Autophosphorylierung an Ser²¹² und Ser³⁷⁶ und weiteren Aminosäuren nötig [89]. Der Signalweg ist in Abbildung 4.1.11 dargestellt.

MSK2 hat nahezu die gleiche Sequenz wie MSK1 und wird höchstwahrscheinlich ebenfalls durch Erk1/2 und p38 MAPK aktiviert. CREB wird durch pMSK1 *in vitro* durch Phosphorylierung an Ser¹³³ aktiviert. Eine entsprechende Rolle von MSK2 ist zu vermuten, konnte bisher aber nicht gezeigt werden [90].

Kinexus: MEK3/6 und p38 MAPK sind in TM7 und TM2 nicht phosphoryliert, d.h., beide Kinasen sind wahrscheinlich nicht reguliert. Die Ergebnisse zu pErk1/2 sind widersprüchlich, deuten aber am ehesten auf eine verminderte Aktivität des MAPK/Erk Signalweges hin. Die verminderte Phosphorylierung an MSK1 Ser³⁷⁸ in TM7 im Vergleich zu TM2 und mock entsprechen diesen Ergebnissen. Der von Kinexus verwendete Antikörper kann zusätzlich mit MSK2 kreuzreagieren, das Protein mit der Bezeichnung „MSK1 (66)“ steht für MSK2 (s. Korrespondenz mit Kinexus in Anlage 2). Die Phosphorylierung von MSK2 Ser³⁷⁶ ist in TM7 gesteigert verglichen mit TM2 und mock. Dies deutet auf eine Aktivierung von MSK2. In TM2 ist die Phosphorylierung und Aktivierung von MSK2 am geringsten.

Zusammenfassend weisen unsere Daten auf eine geringere Aktivität von MSK1 bei gleichzeitig verstärkter Aktivität von MSK2 durch CD97 hin, die Abbildung 4.1.12 zeigt die Regulation. Die geringere Aktivierung von MSK2 in TM2 deutet erneut auf die supprimierende Wirkung von TM2 auf das endogene CD97.

pCREB → Apoptoseschutz

Neben MSK1/2 [89] führt Akt1 zur Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung an Ser¹³³. Es folgt eine CREB-abhängige Aktivierung des c-fos-Promotors [91]. Die gesteigerte Expression von CREB-Zielgenen führt zur Förderung des Zellüberlebens [92], siehe dazu Abbildung 4.1.11 und 4.1.13.

Kinexus: TM7 steigert pCREB Ser¹³³ im Vergleich zu TM2 und mock, damit geht eine verstärkte Aktivierung der Kinaseaktivität einher. In TM2 ist die Phosphorylierung am geringsten, das deutet auf die Wirkung von TM2 als Kompetitor hin. Da TM7 pMSK1 senkt, ist eine Aktivierung von CREB über diesen Signalweg unwahrscheinlich. TM7 steigert aber pMSK2, es könnte an der Phosphorylierung von CREB beteiligt sein. Der genaue Mechanismus sowie der maßgeblich beteiligte Signalweg bleiben jedoch unklar.

Zusammenfassend könnten die Ergebnisse auf einen Schutz vor Apoptose durch CD97 in HT1080 deuten. Das ist weiterführend zu prüfen. Die mögliche Regulation wird in Abbildung 4.1.12 und 4.1.14 dargestellt.

4.1.2.2. PKR1 und c-Jun werden durch CD97-Überexpression reguliert

pPKR1 → pc-Jun

PKR (auch bezeichnet als PKR1 in den Daten des Multi-Immunoblot™ oder EIF2AK2) ist eine Kinase, die in der Abwehr von Virusinfekten für Zellen essentiell ist, aber auch für die Zellantwort auf Signale durch Toll-like-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und zellulären Stress. PKR kann antiproliferative und antivirale Mechanismen aktivieren und reguliert Apoptoseinduktion [93, 94]. Humanes PKR trägt 15 Autophosphorylierungsstellen, wobei nur die Phosphorylierung an Thr⁴⁴⁶ und Thr⁴⁵¹ die PKR-Kinase aktivieren [95]. In embryonalen Mausfibroblasten (MEF) aktiviert pPKR JNK1 aber auch Akt via Tumor Nekrose Faktor (TNF). Dies geschieht bei gleichzeitiger Suppression von Erk1/2 und p38MAPK durch pPKR. Auf diese Weise wird durch aktiviertes pPKR die Zellproliferation der MEF gefördert [96]. Die MAPK-Familie der JNKs können verschiedene Signalwege beeinflussen und sind essentielle Regulatoren für physiologische und pathologische Prozesse. Die JNKs umfassen JNK1, JNK2 und JNK3. Durch alternatives Splicen am C-Terminus entstehen insgesamt 10 Isoformen der JNKs zwischen 46 kDa bis 54 kDa. Welche Effekte durch JNKs erzielt werden, ist abhängig von verschiedenen extrazellulären und intrazellulären Faktoren. Wichtiges Substrat für JNKs ist c-Jun [97]. JNK1 beispielsweise kann c-Jun an Ser⁶³ und Ser⁷³ phosphorylieren, welches so aktiviert wird [98]. Dominant negative Mutationen von c-Jun führen zu einem Zellzyklusarrest in G1 in HT1080 Zellen [99]. Aktives pc-Jun schützt in Fibroblasten vor Apoptose durch direkte negative Regulierung der p53 Expression [100]. Der Signalweg ist in Abbildung 4.1.13 veranschaulicht. Eine Beeinflussung des Signalweges durch CD97 ist deshalb interessant, weil möglicherweise Rückschlüsse auf die Regulation der Apoptose von HT1080 geschlossen werden könnten.

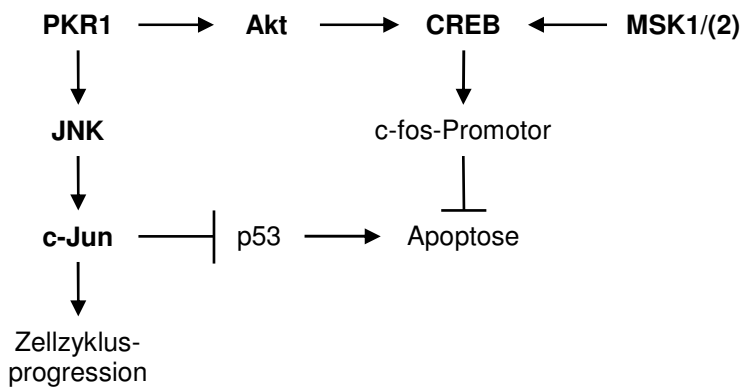


Abb. 4.1.13 Regulation von Zellzyklusprogress und Apoptose

Kinexus: TM7 steigert pPKR1 Thr⁴⁵¹ im Vergleich zu TM2 und mock, in TM2 ist es am geringsten. JNK ist gleich stark in den Klonen phosphoryliert und wird daher nicht durch TM7 reguliert. Dagegen ist pc-Jun Ser⁷³ in TM7 im Vergleich zu TM2 und mock gesteigert. TM2 senkt pPKR1 Thr⁴⁵¹ und pc-Jun Ser⁷³ im Vergleich zu mock. In TM7 wird p38MAPK nicht aktiviert. Erk1/2 wird durch TM7 reguliert, Akt1-Expression und damit die Aktivierung werden gesteigert (siehe dazu Kapitel 4.1.1.1. und 4.1.2.1.).

Zusammenfassend führt CD97 zu einer gesteigerten Aktivität von PKR1 und der anti-apoptotischen Kinase c-Jun und könnte auf diese Weise Apoptoseschutz in HT1080 Zellen vermitteln (Abb. 4.1.14). Takada et al. beschreibt einen Apoptoseschutz durch Aktivierung von PKR1 und JNK [96]. Durch CD97 könnte ein Apoptoseschutz in den HT1080 durch Aktivierung von PKR1 und c-Jun möglich sein, allerdings bei fehlender Aktivierung von JNK. Dieses war in den untersuchten Klonen gleich stark phosphoryliert und damit gleichermaßen aktiviert. Ursächlich für die geringe Phosphorylierung von PKR1 Thr⁴⁵¹ und c-Jun Ser⁷³ in TM2 könnte wiederum die kompetitive Wirkung von TM2 auf das endogene CD97 sein. In Versuchen zur Apoptoseregulation soll ein Einfluss von CD97 in den HT1080 Zellen untersucht werden.

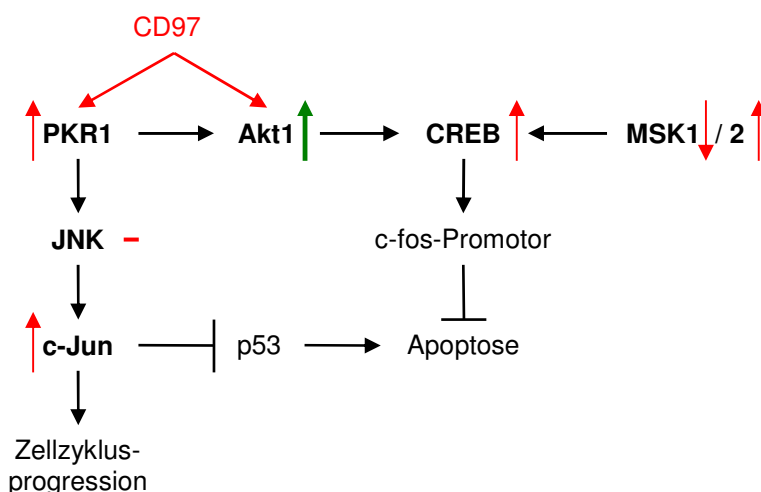


Abb. 4.1.14 Einfluss von CD97 auf Apoptose

Akt1 und PKR1 werden durch CD97 aktiviert und könnten zu einer Zellzyklusprogression bei gleichzeitigem Schutz vor Apoptose führen.

4.1.3. CD97 reguliert Effektorproteine des mTOR-Signalweges - ein Hinweis auf gesteigerte Proliferation?

mTOR → pRb

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg ist an der Regulation der Apoptose beteiligt. Nach Aktivierung der PI3-Kinase wird via aktivem pPDK1 Akt1 phosphoryliert. Es folgt die Aktivierung von mTOR. Die mTOR Effektorproteine 4E-BP1 und P70S6K werden nun phosphoryliert, wodurch die Translation der Zellen gefördert wird [101, 102]. 4E-BP1 wird durch mTOR an Thr³⁷/Thr⁴⁶ phosphoryliert, dadurch wird 4E-BP1 für die Phosphorylierung an weiteren Aminosäuren vorbereitet. Je stärker 4E-BP1 phosphoryliert wird, desto stärker ist seine Inaktivierung. Aktives 4E-BP1 bindet den Translation-induzierenden-Faktor eIF4E und verhindert so die Translation [103].

P70S6K und P85S6K sind Isoformen der S6 Kinase, entstanden durch alternative Translation.

P85S6K ist 23 Aminosäuren länger, das bewirkt eine Translokation des Proteins in den Zellkern.

P70S6K wird durch Phosphorylierung an insgesamt sieben Aminosäuren durch PI3-Kinase aktiviert, unter anderem an Thr³⁸⁹, Ser³⁷¹ und Thr⁴²¹/Ser⁴²⁴. Die Regulation von P85S6K ist ähnlich [104, 105].

Die Phosphorylierung pP85S6K Thr⁴¹² wurde in den Originaldaten des Multi-Immunoblot™ zur Order 2141 vom 14.10.2009 ungenau als pP85S6K Thr³⁸⁹ bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde durchgehend die exakte Bezeichnung pP85S6K Thr⁴¹² verwendet (siehe Korrespondenz mit Kinexus in Anlage 2).

Erst pP70S6K Thr³⁸⁹ erreicht volle Kinaseaktivität [104]. Es folgt der Zellzyklusprogress in der G1 Phase und eine Expression von Cyclin D1 und CDK4 [106]. Der Cyclin D1-CDK 4-Komplex phosphoryliert das Tumorsuppressorprotein Rb an Ser⁸⁰⁷, Ser⁸¹¹ und Ser⁷⁸⁰. Dadurch wird Rb in der G1 Phase des Zellzyklus inaktiviert. Es folgt die Dissoziation des Rb-E2F-1-Komplexes. Der dadurch freiwerdende Transkriptionsfaktor E2F-1 ermöglicht nachfolgend die Zellproliferation [107, 108]. Unphosphoryliertes, aktives Rb hemmt Zellprogression [109]. In Abbildung 4.1.15 ist dieser Signalweg dargestellt.

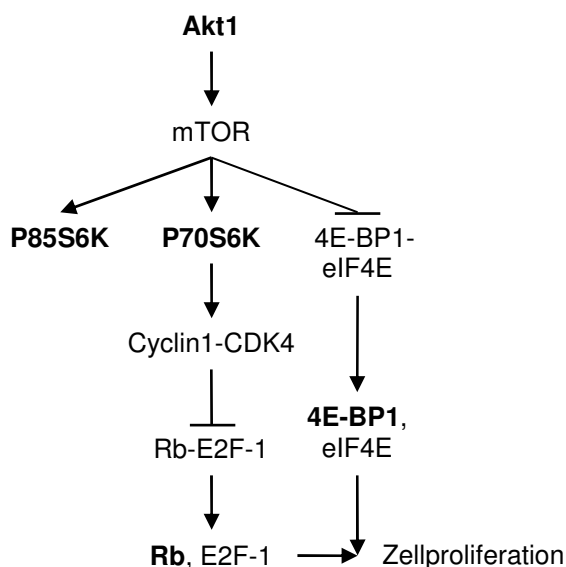


Abb. 4.1.15 mTOR-Signalweg reguliert die Zellproliferation
Interessant ist daher die Phosphorylierung der Proteine des mTOR- Signalweges.

Kinexus: TM7 steigert pP70S6K Thr³⁸⁹ im Vergleich zu TM2 und mock, wobei TM2 pP70S6K Thr³⁸⁹ im Vergleich zu mock senkt. TM7 senkt pP85S6K Thr⁴¹² im Vergleich zu TM2 und mock, TM2 steigert es im Vergleich zu mock. TM7 steigert pRb Ser⁷⁸⁰ und Ser⁸⁰⁷+ Ser⁸¹¹ im Vergleich zu TM2 und mock.

WB: TM7 steigert tendenziell 4E-BP1 und die mehrfach phosphorylierten Formen von p4E-BP1 Thr³⁷/Thr⁴⁶ im Vergleich zu TM2 und mock, wobei Gesamtexpression und Phosphorylierung in mock je am geringsten sind. Das wenig phosphorylierte 4E-BP1 ist in TM7 vermindert im Vergleich zu TM2. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TM7 die Phosphorylierung von 4E-BP1 Thr³⁷/Thr⁴⁶ steigert, sodass vor allem die mehrfach phosphorylierten 4E-BP1 in TM7 nachzuweisen sind. Diese Hyperphosphorylierung führt zur Inaktivierung von 4E-BP1 durch TM7. TM7 und TM2 senken beide tendenziell pP85S6K Thr⁴¹² verglichen mit mock. Die Phosphorylierung an P70S6K Thr³⁸⁹ konnte im Western Blot mit n=3 nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend werden die Effektorproteine des mTOR-Signalweges P85S6K, 4E-BP1 und Rb durch CD97 stärker inaktiviert, so könnte die Zellproliferation gesteigert werden (Abb. 4.1.16). In nachfolgenden Proliferationsassays soll dies untersucht werden.

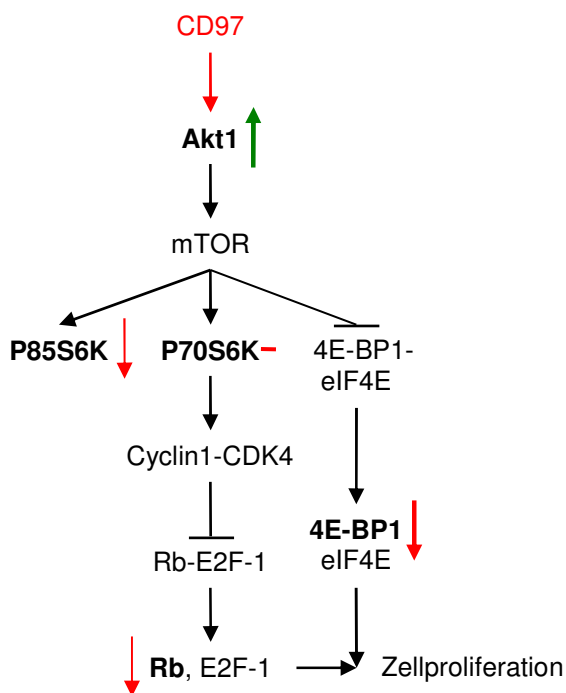


Abb. 4.1.16 CD97 reguliert den mTOR-Signalweg
CD97 führt über den mTOR-Signalweg zu vermehrter Inaktivierung von Rb und 4E-BP1 und könnte dadurch die Zellproliferation steigern.

4.1.4. CD97 reguliert Proteine des Zellzyklus

B23 und CDK1 → Zellzyklus

Zellzyklus wird in den Zellen streng reguliert. Nukleäres Akt, vor allem Akt2, schützt B23 vor dem proteolytischen Abbau und unterstützt die Proteinstabilität. Das gewährleistet Zellüberleben und treibt den Zellzyklus voran [110]. Plk1 phosphoryliert B23 an Ser⁴, dieser Vorgang ist CDK1-abhängig und für die Mitose spezifisch. Funktionsverlust führt zu Störung der Mitose. Durch pB23 Ser⁴ werden

Zentrosomenfunktion, Schwesterchromatinaufteilung und Zellteilung reguliert [111]. Weiterhin sind an der Zellzyklusregulation CDKs beteiligt. Dephosphorylierung von pCDK1 Tyr¹⁵ durch Cdc25 oder Pyp3 aktiviert CDK1, eine Zellzyklusprogression am G2/Mitose-Kontrollpunkt ist möglich [112]. Gleichmaßen wird pCDK2 Tyr¹⁵ durch die Phosphatase Cdc25 aktiviert [113]. Daraus resultiert eine Zellzyklusprogression von der G1 Phase in die Synthesephase (S-Phase) [41]. Der Einfluss der untersuchten Proteine auf den Zellzyklus ist in Abbildung 4.1.17 dargestellt.

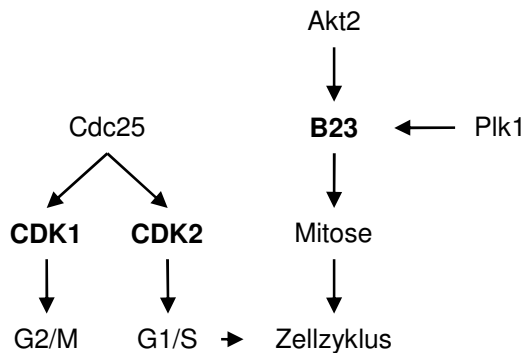


Abb. 4.1.17 CDK1/2 und B23 regulieren den Zellzyklus

Kinexus: B23 wird in HT1080 insgesamt stark phosphoryliert. TM7 senkt pB23 Ser⁴ im Vergleich zu TM2 und mock. TM7 senkt pCDK1/2 Ser¹⁵ im Vergleich zu TM2, so wird CDK1/2 durch TM7 stärker aktiviert. In mock ist pCDK1/2 Ser¹⁵ am geringsten.

Zusammenfassend könnte durch CD97 der Zellzyklusprogress beeinflusst werden, da B23 und CDK1/2 an der Mitoseregulation beteiligt sind. Unklar bleibt allerdings die spezifische Regulation des Zellzyklus durch CD97, siehe dazu Abbildung 4.1.18. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um einen Einfluss von CD97 auf den Zellzyklus in HT1080 zu klären.

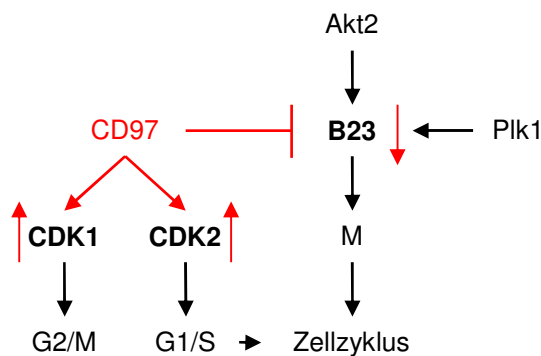


Abb. 4.1.18 Mögliche Zellzyklusregulation durch CD97
CD97 reduziert die Aktivität von B23, während die von CDK1/2 gesteigert wird

4.1.5. Der Einfluss von CD97 auf SMAD

SMAD1/5/9

SMAD1/5/9 (SMAD9=SMAD8) sind rezeptorregulierte Proteine, die nach Phosphorylierung durch BMPs in den Zellkern translozieren und dort zur Aktivierung verschiedener Gene führen [114]. SMAD 1/5/9 werden jeweils an zwei c-terminalen Serinen phosphoryliert und aktiviert, diese sind stark konserviert und von einem nichtphosphorylierten Serin flankiert [115].

TM7 steigert pSMAD1/5/9 Ser⁴⁶³+Ser⁴⁶⁵/Ser⁴⁶³+Ser⁴⁶⁵/Ser⁴⁶⁵+Ser⁴⁶⁷ im Vergleich zu TM2 und mock.

Zusammenfassend wird durch CD97 die Aktivität von SMAD1/5/9 gesteigert.

4.1.6. Proteine mit fehlender Phosphorylierung in den HT1080 Zellen

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Proteinen wurden im Multi-Immunoblot™ weitere untersucht, die in den HT1080 Zellen keine Phosphorylierung zeigten. Zu den Proteinen mit fehlender Phosphorylierung in den untersuchten HT1080 Zellen gehören: GSK3 alpha Ser²¹, GSK beta Ser⁹, MEK3/6 Ser¹⁸⁹/ Ser²⁰⁷, p38 alpha MAPK Thr¹⁸⁰ + Tyr¹⁸², NR1 Ser⁸⁹⁶, Akt1 Ser⁴⁷³, Akt1 Thr³⁰⁸, PKC epsilon Ser⁷²⁹, RSK 1/3 Thr³⁵⁹ + Ser³⁶³/ Thr³⁵⁶ + Ser³⁶⁰, STAT 1 Tyr⁷⁰¹, STAT5A Tyr⁶⁹⁴, Src Tyr⁴¹⁸.

Im Western Blot wurde die fehlende Phosphorylierung für GSK3 beta Ser⁹ und Akt1 Thr³⁰⁸ bestätigt. Außerdem war in HT1080 die PI3-Kinase p85 /p55 nicht phosphoryliert und PI3-Kinase p110 gamma nicht exprimiert.

4.2. CD97 steigert Migration in HT1080 durch Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges und Inhibierung von Src

4.2.1. Überexpression von CD97 steigert Migration in HT1080

Es wurden Versuche zur Bestimmung des Migrationskoeffizienten der 2D-Einzelzellmigration und zum Wundverschluss in HT1080 durchgeführt, wie in Material und Methoden beschrieben.

Für HT1080 Zellen ist bekannt, dass sie in der Lage sind in angrenzendes Gewebe einzuwachsen und schnell zu migrieren [116]. Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie häufig für *in vitro*

Migrationsversuche verwendet. Überexpression von CD97 steigert die Migration in HT1080 [11, 21].

Unklar war bisher, welcher Signalweg daran maßgeblich beteiligt ist. Es sind bereits Signalwege identifiziert, die in HT1080 durch CD97 reguliert werden. Durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren soll untersucht werden, ob diese für die CD97-Migrationssteigerung von HT1080 verantwortlich sind. Im durchgeführten 2D-Einzelzellmigrationsmodell spielt die Interaktion der Zellen aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Kontakte eine untergeordnete Rolle. Dadurch verursachte mögliche Regulationen der Migrationsgeschwindigkeit können so ausgeschlossen werden.

Der durchgeführte Wundverschluss ist ein Modellversuch zur Untersuchung der Zellmigration, wobei die Zellen über bestehende Zellkontakte miteinander interagieren und sich daher gegenseitig beeinflussen können. Im Wundverschluss-Modell wird die Zellmigration durch weitere Prozesse wie Proliferation und Apoptose beeinflusst. Damit unterscheidet sich der Versuch zum Wundverschluss von dem der 2D-Einzelzellmigration.

TM7 steigert den Migrationskoeffizienten in HT1080 verglichen mit TM2 um 52% und mock um 44% (jeweils $p < 0,001$). TM2 reduziert den Migrationskoeffizient im Vergleich zu mock um 14% ($p < 0,01$).

TM7 beschleunigt den Wundverschluss in HT1080, dagegen wird er durch TM2 verlangsamt.

Allerdings erfolgt der vollständige Verschluss der Wunde in TM7 und mock zum gleichen Zeitpunkt, in TM2 verzögert. Es wurden keine Zellbrücken zwischen den Wundrändern beobachtet.

Zusammenfassend steigert CD97 in HT1080 die Einzelzellmigration und beschleunigt den Wundverschluss. Unsere Ergebnisse zur Einzelzellmigration konnten die von Galle et al. bestätigen. Der Migrationskoeffizient war in den vorherigen Versuchen um den Faktor drei in TM7 größer als in mock [11], in den hier durchgeführten Versuchen nur um den Faktor 1,8. Dies könnte an einer methodenbedingten Messungenauigkeit liegen. Sehr schnell migrierende Zellen legen innerhalb von 13 Stunden größere Strecken zurück. Es ist dann nicht mehr eindeutig die ursprüngliche Lokalisation der Zelle zu ermitteln. Daher werden solche Zellen in der Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit nicht berücksichtigt, sodass der ermittelte Wert kleiner ausfällt, als er tatsächlich ist. Die Verringerung des Migrationskoeffizienten in TM2 im Vergleich zu TM7 und mock, die Galle et al. beschreibt [11], konnte ebenfalls bestätigt werden. Die Expression von Akt1 und die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges werden durch TM7 im Vergleich zu mock gesteigert, während sie durch TM2 gesenkt werden. Die Regulation ist gleichsinnig mit der des Migrationskoeffizienten, sodass ein Zusammenhang zwischen den gefundenen Ergebnissen durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren untersucht wurde. TM7 steigert pSrc Tyr⁵²⁹ und TM2 reduziert es im Vergleich zu mock. Die Regulation von pSrc Tyr⁵²⁹ ist ebenso gleichsinnig zum Migrationskoeffizienten. Die untersuchte Phosphorylierung wirkt allerdings inhibitorisch, spezifische Inhibitoren reduzieren die Kinaseaktivität weiter.

Der Wundverschluss wird durch CD97 beschleunigt, dies deutet ebenfalls auf eine CD97 induzierte Migrationssteigerung. Ein Einfluss durch Proliferation und Apoptoserate auf den CD97-beschleunigten Wundverschluss wurde nicht gesondert untersucht. Diese Einflussfaktoren sind im Wundverschlussversuch nicht auszuschließen und es bleibt eine Regulation von CD97 auf Proliferationsgeschwindigkeit und/ oder Apoptoserate in HT1080 zu prüfen.

Durch Green et al. wurde der Wundverschluss für Fibroblasten in vitro beschrieben. Es wurde die Ausbildung von Zellbrücken zwischen den Wundrändern beobachtet [39]. In dem hier durchgeführten Versuch konnten diese Zellbrücken nicht beobachtet werden. Die Ausbildung dieser Zellbrücken könnte von der Zelldichte abhängig sein. Weitere Versuche mit unterschiedlichen Zelldichten sollen den Einfluss von CD97 auf die Ausbildung der Zellbrücken untersuchen.

4.2.2. Spezifische Inhibitoren für Src und den PI3-Kinase/Akt-Signalweg beeinflussen die CD97-induzierte Migration

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Inhibitoren verwendet. Zur Übersicht sind diese in Abbildung 4.2.1 dargestellt, sowie ihre Wirkung auf die beeinflussten Signalwege.

In den durchgeführten Einzelzellmigrationsversuchen konnten durch den Einsatz von drei Inhibitoren wichtige Hinweise auf die an der Regulation beteiligten Signalwege gefunden werden. Diese drei sowie zwei weitere Inhibitoren wurden im Wundverschluss verwendet, um die Signalwege zu verifizieren, die CD97-Migrationssteigerung in HT1080 regulieren.

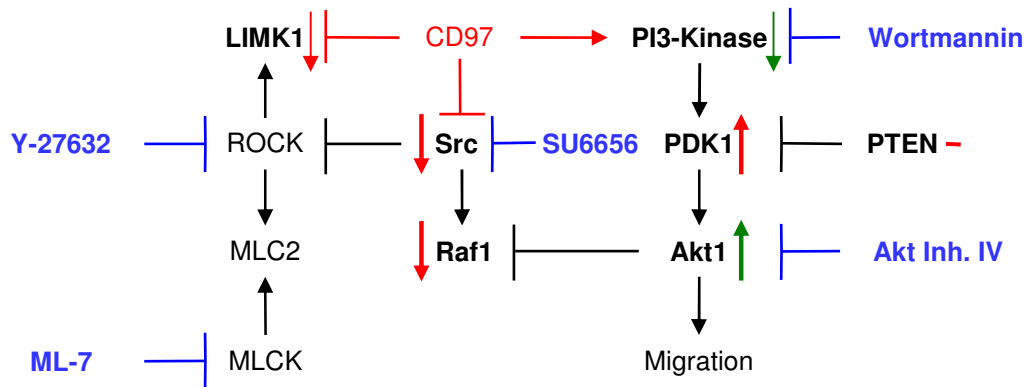


Abb. 4.2.1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren (blaue Schriftfarbe) und deren Wirkung auf die Signalwege

Die durch CD97 verursachten Regulationen der Proteinkinaseaktivität (abgeleitet aus der jeweiligen Phosphorylierung) sind in roter Farbe dargestellt, alleinige Veränderungen der Proteinexpression in grüner Farbe. „Dünne“ Pfeile zeigen eine Tendenz, „dicke“ Pfeile signifikante Ergebnisse. Pfeile nach oben bedeuten Steigerung der Kinaseaktivität, Pfeile nach unten eine Verringerung. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine sind „fett“ markiert.

Akt Inhibitor IV verhindert die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges. Der genaue Wirkmechanismus vom Akt Inhibitor IV ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Obwohl durch den Einsatz von Akt Inhibitor IV in Viruszellen pAkt Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ steigen, resultiert eine verminderte Aktkinaseaktivität. Dies zeigt sich durch ein vermindertes p4E-BP1, sowie die antivirale Wirkung des Inhibitors auf die Replikation verschiedener Viren [117]. Weiterhin konnten Lee et al. die spezifische Wirkung des Akt Inhibitors IV auf den PI3-Kinase/Akt-Signalweg durch Inhibierung der PI3-Kinase/Akt-abhängigen Proliferation in germinalen Stammzellen der Maus nachweisen [118]. Es ist bekannt, durch konstitutive Sekretion von PDGF ist die PI3-Kinase in HT1080 dauerhaft aktiviert, woraus ein konstitutiv aktives Akt resultiert [32]. Aktiviertes Akt1 führt zu gesteigerter Zellmotilität in verschiedenen Zelllinien [56]. In Mausfibroblasten wird durch Akt1 die Migration gesteigert, während sie durch Akt2 gesenkt wird [119]. In HT1080 Zellen ist der PI3-Kinase/Akt-Signalweg an der Regulation der Migration beteiligt. Inhibierung des Signalweges durch Decursinol angelate verhindert Migration der Zellen [58]. Eine Überexpression von Akt steigert die Migration der HT1080 auf das Doppelte, Überexpression eines konstitutiv aktiven Akts sogar auf das Dreifache [57]. Es gibt also zahlreiche Hinweise, dass der PI3-Kinase/Akt-Signalweg an der Regulation der Migration beteiligt ist (vgl. dazu auch Kapitel 4.1.1.1.). Da in HT1080 der Migrationskoeffizient und der Wundverschluss in TM7 gesteigert werden, gleichzeitig die Akt1 Expression erhöht und der PI3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert wird, wurde die Wirkung des Akt Inhibitors IV auf den Migrationskoeffizienten und den Wundverschluss untersucht.

Akt Inhibitor IV senkt den durch TM7 gesteigerten Migrationskoeffizienten in der 2D-Migration von HT1080 Zellen um 27% mit $p < 0,001$. In TM2 hat der Akt Inhibitor IV keinen signifikanten Einfluss auf den Migrationskoeffizienten. In mock wurde durch den Akt Inhibitor IV der Migrationskoeffizient um 14% gesenkt mit $p < 0,01$.

Der Akt Inhibitor IV verzögert den vollständigen Wundverschluss in mock, TM2 und TM7, obwohl der Wundverschluss in TM2 und TM7 zunächst ähnlich dem der jeweiligen Kontrolle verläuft.

Zusammenfassend wird die CD97-induzierte Steigerung des Migrationskoeffizienten durch den Akt Inhibitor IV verringert, der durch CD97 beschleunigte Wundverschluss wird durch Akt Inhibitor IV gleichsinnig reduziert. CD97 steigert die Akt1 Expression und tendenziell pAkt Ser⁴⁷³ und dadurch den Migrationskoeffizienten in der 2D-Migration von HT1080. Unterbrechung dieses Signalweges durch den verwendeten Akt Inhibitor IV reduziert 2D- Migration wieder. Die Expression von Akt1, pAkt Ser⁴⁷³ und der Migrationskoeffizient sind im C-terminal verkürzten CD97/TM2 im Vergleich zu mock reduziert. Der Akt Inhibitor IV hat außerdem keinen signifikanten Einfluss auf den Migrationskoeffizienten in TM2. TM2 scheint als Kompetitor zu wirken und supprimiert wahrscheinlich die endogene CD97-Wirkung. Da die CD97-Steigerung der Migration in TM2 supprimiert ist, wird die Migration durch den Akt Inhibitor IV in TM2 nicht zusätzlich gesenkt.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse auf eine entscheidende Rolle von Akt1 in der Signaltransduktion von CD97 nach intrazellulär, die zu gesteigerter Migration führt. Nicht eindeutig zu belegen ist allerdings, ob allein die Steigerung der Akt1-Expression eine Migrationssteigerung vermittelt oder eine Akt-Aktivierung dazu nötig ist. Akt Inhibitor IV reduziert die Kinaseaktivität von Akt [117, 118], eine Inhibierung der Akt-Expression ist bisher nicht nachgewiesen worden. Obwohl eine Phosphorylierung an den klassischerweise Akt-aktivierenden Aminosäuren Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ im durchgeführten Western Blot nur tendenziell, aber nicht ausreichend nachgewiesen werden konnten, ist eine Akt-Kinaseaktivität wahrscheinlich. Der Akt Inhibitor IV reduziert den vermutlich CD97-induzierten Anstieg der Akt-Kinaseaktivität und dadurch die CD97-induzierte Migrationssteigerung in HT1080. Die Kinaseaktivität von Akt ist also für die CD97-Migrationssteigerung wahrscheinlich essentiell, eine Akt-Expressionssteigerung allein möglicherweise nicht ausreicht. Weder im Kinexus-Assay, noch im Western Blot war pThr³⁰⁸ zu detektieren. Auch pSer⁴⁷³ wurde im Kinexus-Assay nicht nachgewiesen. Allerdings konnte im Western Blot eine tendenzielle Steigerung von pSer⁴⁷³ durch CD97 gezeigt werden, d.h. eine Aktivierung von Akt liegt tendenziell vor. Es gibt zahlreiche weitere Akt1-Phosphorylierungsstellen, deren Funktionen zum Teil noch unklar sind und die möglicherweise auch an der Aktivierung der Kinaseaktivität unabhängig von Thr³⁰⁸ oder Ser⁴⁷³ beteiligt sein können. Diese könnten weiter untersucht werden.

Weiterhin sind in HT1080 PI3-Kinase und Akt konstitutiv aktiv durch konstitutive Sekretion von PDGF [32]. CD97 könnte den PI3-Kinase/Akt-Signalweg de novo aktivieren und so die Expression von Akt1 steigern bzw. dieses aktivieren, oder es könnte eine zusätzliche Aktivierung des bereits konstitutiv aktiven Signalweges weiter fördern. Das lässt sich aus den hier vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig ableiten.

Wortmannin ist ein potenter, aber nicht selektiver Inhibitor der PI3-Kinase. Dabei bildet sich ein kovalenter Komplex aus Wortmannin und der katalytischen Einheit der PI3-Kinase, die für die Kinaseaktivität wichtig ist. Wortmannin kann auch den mTOR-Signalweg inhibieren [120]. Unsere Ergebnisse aus Kinexus und den Western Blot Ansätzen geben Hinweise, dass in TM7 der PI3-Kinase/Akt-Signalweg stärker aktiviert wird als in TM2 und mock. Der Migrationskoeffizient der Einzelzellmigration ist in TM7 größer als in TM2 und mock. Es besteht die Vermutung, die durch CD97 gesteigerte Migration könnte via PI3-Kinase/Akt-Signalweg vermittelt werden.

Der Migrationskoeffizient für die 2D-Einzelzellmigration und der 2D-Wundverschluss in HT1080 Zellen wurden unter Zugabe von Wortmannin bestimmt.

Wortmannin senkt den durch TM7 gesteigerten Migrationskoeffizienten um 46% mit $p < 0,001$.

Auch in mock wurde der Migrationskoeffizient um 23% gesenkt mit einem $p < 0,001$. In TM2 wurde der Migrationskoeffizient durch Wortmannin nicht signifikant verändert.

Wortmannin verzögert den Wundverschluss in mock, TM2 und TM7. In TM2 wird der Wundverschluss am geringsten verzögert.

Zusammenfassend werden die CD97-induzierte Steigerung vom Migrationskoeffizient sowie der beschleunigte Wundverschluss durch den spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase, Wortmannin, gesenkt. Die PI3-Kinase scheint folglich eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung von CD97 zu haben, die zu gesteigerter Migration in HT1080 führt.

Durch CD97 wird der PI3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert und so die Migration gesteigert. Nur ein vollständiges (full-length) CD97 ermöglicht die Signaltransduktion nach intrazellulär und steigert die Migration. Das auf C-terminal verkürzte CD97/TM2 wirkt wahrscheinlich als Kompetitor, reduziert die CD97-Signalweiterleitung und damit die Migration, aufgrund der supprimierenden Wirkung auf das endogene CD97. Wortmannin reduziert die Migration in TM2 nur kaum, da der PI3-Kinase/Akt-Signalweg und die Migration in TM2 bereits reduziert sind. Da Wortmannin auch in der Lage ist mTOR zu inhibieren, ist eine Rolle dieser Kinase bei der Signaltransduktion nicht ausgeschlossen. Dies ist eher unwahrscheinlich, da der mTOR-Signalweg klassischerweise nicht mit der Regulation der Migration in Verbindung gebracht wird.

Die gleichsinnige Wirkung von Wortmannin und Akt Inhibitor IV, d.h. CD97-induzierte 2D-Migrationssteigerung zu reduzieren, deuten auf eine entscheidende Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalweges in der CD97- Signaltransduktion hin, die die Migrationssteigerung in HT1080 induziert.

SU6656 als selektiver Src Kinase Inhibitor, ist geeignet die Signaltransduktion und Funktion von Src in Zellen zu untersuchen [121]. Durch Dephosphorylierung von Tyr⁵²⁹ wird eine gesteigerte Aktivierung von Src und damit eine gesteigerte Adhärenz in Schilddrüsenkarzinomzellen der Ratte erreicht [71]. Folglich müssen durch einen Anstieg von pSrc Tyr⁵²⁹ die Kinaseaktivität und die Adhärenz von Zellen reduziert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch CD97 pSrc Tyr⁵²⁹ in HT1080 gesteigert wird und es so zu einer Inhibierung von Src kommt, fraglich ist, ob dadurch die Zellmigration gesteigert werden kann.

In HT1080 Zellen gibt es eine mesenchymale und eine amöboide Form der Tumordinvasion. Ein Wechsel zwischen beiden Formen ist möglich. Durch Inhibierung von Src oder Calpain 2 wird die mesenchymale Form der Migration reduziert. Gleichzeitig wird die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix gesenkt. Die amöboide Migration dagegen ist unabhängig von Src und Calpain 2 [69].

Die durch TM7 gesteigerte Einzelzellmigration wird bei Zugabe vom Src Inhibitor SU6656 weiter gesteigert. Der Migrationskoeffizient steigt in TM7 um weitere 15%, mit $p < 0,01$. In TM2 steigt durch Zugabe von SU6656 der Migrationskoeffizienten um 60%, mit $p < 0,001$. In mock war kein Einfluss auf den Migrationskoeffizienten durch SU6656 nachzuweisen.

SU6656 verzögert den Wundverschluss in TM7, mock und TM2. In TM7 ist dieser Einfluss am geringsten. Der vollständige Wundverschluss in TM7 ist nach 27h, zum gleichen Zeitpunkt wie in der Kontrolle, erreicht. Dagegen ist der vollständige Wundverschluss in mock und TM2 verzögert.

Zusammenfassend wird durch CD97 pSrc Tyr⁵²⁹ in HT1080 gesteigert, woraus eine verminderte Src Kinaseaktivität resultiert. Durch Zugabe des selektiven Src Inhibitors SU6656 wird die Kinaseaktivität weiter herabgesetzt. Diese Inhibierung von Src steigert die CD97-induzierte Zunahme des Migrationskoeffizienten in HT1080 weiter. Die supprimierende Wirkung von TM2, im Sinne eines Kompetitors, auf die endogene CD97-Wirkung verringert den Migrationkoeffizienten von HT1080/TM2. In TM2 ist Src weniger an Tyr⁵²⁹ phosphoryliert und dadurch stärker aktiviert als in TM7. Durch Inhibierung von Src mit SU6656 in TM2 steigt der Migrationskoeffizient jedoch stark an. Das zeigt, dass Inhibierung von Src durch CD97 ein wichtiger Schritt in der Signaltransduktion von CD97-induzierter Migrationssteigerung ist. CD97-induzierte Migrationssteigerung wird in HT1080 also durch Inhibierung von Src vermittelt.

Der CD97 beschleunigte Wundverschluss wird durch den Src Inhibitor SU6656 unerwartet verlangsamt. Da SU6656 die Einzelzellmigration beschleunigt, wäre eine Steigerung des Wundverschlusses zu erwarten. Die Verzögerung des Wundverschlusses ist in TM7 am geringsten, verglichen mit mock und TM2. Der Wundverschluss ist eine aus Proliferation, Apoptose und Migration zusammengesetzte Zellfunktion und wird außerdem durch Zell-Zell-Kontakte beeinflusst. Daher könnte SU6656 die Proliferation in einem stärkeren Maße hemmen, als die Einzelzellmigration beschleunigt wird. Wenn SU6656 die Proliferation von HT1080 verzögert, könnte insgesamt ein verzögerter Wundverschluss resultieren, obwohl die Einzelzellmigration durch Inhibierung von Src gesteigert wird. Dafür spricht, dass in TM7, wo die Einzelzellmigration am stärksten gesteigert ist, der Wundverschluss am geringsten verzögert wird verglichen mit mock und TM2.

Proliferationsversuche unter Verwendung von SU6656 sollten diesen Einfluss überprüfen.

4.2.3. ROCK und MLCK sind in CD97-induzierte Migrationssteigerung involviert

Myosin 2 ist an der Entstehung der kontraktilen Kraft während der Zellmigration beteiligt. Die Aktivität von Myosin 2 wird durch Phosphorylierung der Myosin-leichten-Kette (MLC) bestimmt. Die zwei wichtigsten Kinasen, die MLC-Phosphorylierung regulieren, sind MLCK und ROCK. In Fibroblasten phosphoryliert MLCK MLC in der Peripherie der Zelle, wodurch Membranprotrusionen kontrolliert werden. ROCK phosphoryliert MLC im Zentrum der Zellen und fördert dadurch die Ausbildung von fokalen Adhäsionen. Die unterschiedliche Lokalisation der MLC-Phosphorylierung, gesteuert durch MLCK und ROCK, reguliert den Auf- und Abbau der Adhäsionskontakte und des Aktinzytoskeletts und dadurch die Migration von Fibroblasten. Dabei begünstigt ein hoher Umsatz an MLC-Phosphorylierung die Zellmigration [122].

Y-27632 inhibiert zwei Isoformen der Rho-abhängigen Protein Kinase mit der Bezeichnung ROCK-I und ROCK-II. Dadurch wird beispielsweise Myosin der Muskelzelle weniger phosphoryliert und aktiviert [123]. Inhibierung von ROCK in HT1080 durch Y-27632 steigert die Migrationsgeschwindigkeit und Zahl der migrierenden Zellen in einer 2D-Matrix sowie die Adhäsion in HT1080. Es reduziert

pMLC2 Thr¹⁸ und Ser¹⁹. Y-27632 führt zur Ausbildung von langen F-Actin-reichen Protrusionen bei sichelförmiger Zellmorphologie [31]. Der Einfluss von Y-27632 auf den Wundverschluss von HT1080 TM7, TM2 und mock wurde untersucht, um einen Einfluss von CD97 auf ROCK und MLC2 zu untersuchen, siehe dazu auch Abb. 4.2.1.

Y-27632 beschleunigt den Wundverschluss in mock, TM2 und TM7. In TM7 erfolgt der vollständige Wundverschluss bereits nach 18h, 9h eher als in der Kontrolle. Damit wird in TM7 der Wundverschluss stärker beschleunigt als in mock und TM2 (6h schneller in mock und 3h schneller in TM2 als in der jeweiligen Kontrolle).

Zusammenfassend wird der durch CD97 beschleunigte Wundverschluss durch Y-27632 zusätzlich beschleunigt. Niggli et al. beschreibt, dass ROCK-I/ROCKII und damit auch MLC2 an der Regulation der 2D-Migration von HT1080 beteiligt sind [31]. Durch CD97 könnte dieser Signalweg beeinflusst werden, da in TM7 Y-27632 den Wundverschluss am stärksten beschleunigt hat. D.h. CD97 könnte ROCK-I/ROCK-II und damit auch MLC2 regulieren und den Wundverschluss beschleunigen. In weiteren Versuchen muss die genaue Phosphorylierung und damit die Regulation dieser Proteine untersucht werden. Weiterhin muss die Einzelzellmigration von CD97 überexprimierenden HT1080 unter Y-27632 untersucht werden, da der Wundverschluss eine aus Proliferation und Einzelzellmigration zusammengesetzte Zellfunktion ist.

ML-7 ist ein relativ spezifischer, dafür schwacher Inhibitor der MLCK, der durch ATP-kompetitive Hemmung wirkt. In wesentlich höheren Konzentrationen von ML-7 werden auch Protein Kinase A und C gehemmt [124]. ML-7 verhindert Adhäsion und die 2D-Migration von HT1080 vollständig. MLC2 wird durch ROCK oder MLCK an Thr¹⁸ und Ser¹⁹ phosphoryliert. Aus diesem Grund reduzieren beide Inhibitoren, Y-27632 und ML-7, pMLC2 Thr¹⁸ und Ser¹⁹. ML-7 führt zur Ausbildung einer sphärischen Zellmorphologie [31]. Der Einfluss von ML-7 auf den Wundverschluss der HT1080 Klone wurde untersucht.

ML-7 verzögert den Wundverschluss in mock, TM2 und TM7. In mock ist diese Verzögerung am geringsten, in TM2 am stärksten. Verglichen mit allen in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren ist die Verzögerung des Wundverschlusses durch ML-7 am stärksten.

Zusammenfassend wird der durch CD97 beschleunigte Wundverschluss durch ML-7 verzögert. Obwohl Y-27632 und ML-7 beide pMLC2 Thr¹⁸ und Ser¹⁹ reduzieren, resultiert durch ML-7 (inhibiert MLCK) ein verzögerter Wundverschluss und durch Y-27632 (inhibiert ROCK-I/ROCK-II) ein beschleunigter. Allein durch den Einfluss der Inhibitoren auf Phosphorylierung von MLC2 können diese Unterschiede also nicht erklärt werden [31]. Diese Wirkungsweise könnte in den hier durchgeführten Versuchen ebenfalls beobachtet werden. In TM7 wird durch Y-27632 der Wundverschluss am stärksten beeinflusst. ML-7 dagegen verzögert den Wundverschluss in TM2 am stärksten, in TM7 am zweitstärksten. D.h. CD97 könnte die Migration in HT1080 via MLCK und ROCK-I/ROCK-II regulieren, verändert wird diese Signalweiterleitung jeweils durch den Einsatz der beiden Inhibitoren. Die Regulation von MLC2 soll im Western Blot untersucht werden, um die Regulation durch CD97 zu belegen. Weiterhin muss die Einzelzellmigration von CD97 überexprimierenden HT1080 unter ML-7 untersucht werden, um genaue Rückschlüsse auf die Regulation von MLCK/MLC2 ziehen zu können.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse auf eine CD97-induzierte Migrationssteigerung in HT1080, die durch Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges und durch Inhibition von Src vermittelt wird.

4.3. Werden Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose in HT1080 durch CD97 beeinflusst?

Es wurden bei der Auswertung der Expression und Phosphorylierung von Effektorproteinen Hinweise gefundenen, dass CD97 Signalwege beeinflusst, die an der Regulation von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose beteiligt sind. Daher wurden Versuche durchgeführt, die diesen Zusammenhang belegen sollen.

Zunächst wurde mittels MTT-Assay die Proliferation der HT1080 Zellen in Abhängigkeit vom exprimierten Konstrukt untersucht. Durch CD97 besteht wahrscheinlich kein Einfluss auf die Proliferationsrate in HT1080.

Apoptose ist in Zellen ein streng regulierter Prozess. Sie kann durch extrazelluläre Stresssignale induziert werden, dann bezeichnet als extrinsisch induzierte Apoptose. Aber auch durch die Aktivierung innerer Regulationsmechanismen, die durch intrazelluläre Stresssignal ausgelöst werden, kann eine so genannte intrinsisch induzierte Apoptosekaskade aktiviert werden [42]. In HT10800 wurde durch Zugabe von 0,125mM, 0,25mM, 0,5mM und 1mM H₂O₂ die extrinsisch induzierte Apoptose in den HT1080 Zellen ausgelöst. Durch diesen Versuch ergaben sich Hinweise, dass durch CD97 ein Schutz vor Apoptose besteht. Allerdings muss als nächstes überprüft werden, ob durch CD97 eher die extrinsisch oder die intrinsisch induzierte Apoptose reguliert wird.

Es wurde die Regulation des Zellzyklus in HT1080 untersucht. Dazu wurden die Zellen in dem Zellzyklusstadium, in dem sie sich nach 24h Inkubation befanden, fixiert. Durch Zugabe von Propidiumjodid, welches in die DNA interkaliert, kann flowzytometrisch das Zellzyklusstadium bestimmt werden. Diese Versuche zeigen, dass in CD97 überexprimierenden Zellen, der Zellzyklus streng kontrolliert wird. Für genaue Aussagen über die Zellzyklusregulation durch CD97 sind jedoch weitere Versuchsreihen nötig.

All diese durchgeführten Versuche gaben bisher lediglich Hinweise, dass die untersuchten Zellprozesse durch CD97 in HT1080 reguliert sind. Da diese Ergebnisse bisher nicht vollständig vorliegen, sind sie in dieser Dissertation nicht ausführlich dargelegt. Es bedarf weiterer detaillierter Experimente, um die genaue Funktion des CD97 auf diese Zellprozesse nachweisen zu können.

4.4. CD97/TM2 wirkt als Kompetitor des endogenen CD97

CD97 steigert die Einzelzellmigration von HT1080. Interessanterweise verlangsamt das an der TM7 Domäne auf TM2 verkürzte CD97 diesen Migrationsmodus [11]. Das wurde in dieser Arbeit bestätigt. Im Vergleich zu mock steigert TM7 den Migrationskoeffizienten signifikant um 44%, während er durch TM2 signifikant um 14% verringert wird.

Die Expression von Akt1 und tendenziell pAkt Ser⁴⁷³ sind in TM7 gesteigert, in TM2 im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Es zeigt sich also eine Aktivierung des PI3-Kinase-Akt-Signalweges durch TM7, dagegen eine Inhibierung durch TM2. Im Vergleich zu mock wird Src durch TM7 inhibiert und durch TM2 aktiviert. Die CD97-Varianten unterscheiden sich in ihrem Aufbau in der transmembranären und

intrazellulären Domäne, daher wird die Signaltransduktion verändert, was sich in der Phosphorylierung oder im Expressionslevel verschiedener Proteine zeigt. Diese Unterschiede sind dann wiederum für die verschiedenen Migrationsgeschwindigkeiten verantwortlich.

Das auf C-terminal auf TM2 verkürzte CD97 wirkt wahrscheinlich als Kompetitor des endogenen CD97. Es scheint die endogene CD97-Wirkung zu supprimieren. Die Effekte sind mit einer Reduktion der Expression des endogenen full-length CD97 vergleichbar.

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Signaltransduktion von CD97 in humanen Fibrosarkomzellen

eingereicht von:

Susann Brosig

angefertigt an der Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Department für Operative Medizin,
Forschungslaboratorien der Chirurgischen Kliniken I und II

betreut von Prof. Dr. rer. nat. Gabriela Aust

September 2014

CD97 gehört zur Familie der Adhäsions-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (aGPCR). Die Mitglieder dieser Familie werden autokatalytisch gespalten und bestehen aus zwei Fragmenten: einem langen extrazellulären N-terminalen Fragment (NTF) und einem nicht-kovalent gekoppelten C-terminalen Fragment (CTF), welches die sieben-transmembranäre (TM7) Region und die intrazelluläre Domäne umfasst [2]. CD97 wird von malignen Tumoren exprimiert [2, 23]. Die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 dient als Modellzelle, um die 2D-Migration von Tumorzellen in Abhängigkeit von CD97 zu untersuchen. Es stehen stabile Klone von HT1080 zur Verfügung, die CD97 (EGF1,2,5) oder C-terminal verkürztes CD97 mit nur zwei transmembranären Domänen und ohne intrazellulären Anteil, CD97 (EGF1,2,5/TM2), überexprimieren. CD97 (EGF1,2,5) mock Zellen dienen als Kontrolle. Diese Zellen wurden mit einem Konstrukt stabil transfektiert, das die kodierende Region von CD97 (EGF1,2,5) in antisense Richtung einkloniert enthält. Die stabile Überexpression von CD97 (EGF1,2,5) in HT1080 steigert die ungerichtete 2D-Migration von Einzelzellen. Verkürzung von CD97 auf zwei transmembranäre Domänen (TM2) hemmt die Migration im Vergleich zu mock-transfektierten Zellen [11]. Bisher ist nicht bekannt, welche Signalwege in die CD97-induzierte Migrationssteigerung involviert sind.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Überblick über die Signaltransduktion von CD97 in HT1080 Zellen gegeben. Es sind Signalwege identifiziert, die in der CD97-induzierten Migrationssteigerung eine Rolle

spielen. Durch Auswertung von Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™) mit Lysaten von CD97/TM7, CD97/TM2 und mock-transfektierten HT1080 wurde ein Überblick über 37 Phosphorylierungsstellen verschiedener Proteine gewonnen. Anschließend erfolgte im klassischen Western Blot die Validierung der Daten für die wichtigsten Proteine hinsichtlich ihrer Expression und Phosphorylierung. Weitere Proteine, die klassischerweise Migration von Zellen regulieren, wurden untersucht. Spezifische Inhibitoren gegen PI3-Kinase/Akt- Signalweg, Src und ROCK/MLCK wurden in 2D-Migrationsversuchen verwendet, um die Signalweiterleitung bei der CD97-induzierten Migrationssteigerung in HT1080 zu belegen.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Thesen:

1. CD97 aktiviert den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und steigert dadurch die 2D-Migration von HT1080.

Es ist bekannt, dass der PI3-Kinase/Akt-Signalweg die invasive Migration von Zellen reguliert [56] und durch Überexpression von Akt die Migration von HT1080 Zellen gesteigert wird [57]. In der vorliegenden Arbeit erhöht CD97 die Gesamtexpression von Akt1 und die Phosphorylierung von PI3-Kinase/Akt-Signalweg-Mitgliedern. Spezifische Inhibitoren gegen den PI3-Kinase/Akt-Signalweg verringern die CD97-induzierte Steigerung der 2D-Migration. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Aust: im Mausmodell wurde durch CD97 Überexpression pAkt Ser⁴⁷³ gesteigert [28].

2. CD97-Steigerung der 2D-Migration in HT1080 wird durch Inhibierung von Src induziert.

Src, eine Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, reguliert im Komplex mit FAK die Adhäsion und Migrationsfähigkeit von Zellen [64]. Durch CD97 wird in HT1080 Src stärker an Tyr⁵²⁹ phosphoryliert und damit inaktiviert, dadurch steigt die 2D-Migration von HT1080. Spezifische Inhibierung von Src erhöht zusätzlich die CD97-induzierte Migration in HT1080 Zellen.

3. Das C-terminal verkürzte CD97 (EGF1,2,5/TM2) wirkt wahrscheinlich als Kompetitor und supprimiert die endogene CD97-Wirkung.

Die Migration von HT1080 CD97 (EGF1,2,5/TM2) Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle und zu HT1080 CD97 (EGF1,2,5) Zellen durch Inhibierung vom PI3-Kinase/Akt-Signalweg und Aktivierung von Src verringert.

4. CD97 beeinflusst weitere Signalwege, die klassischerweise Zellmigration regulieren

Aktiviertes Cofilin beschleunigt den Umbau zellulärer Aktinfilamente und reguliert so die Zellmigration. Aber nur ein streng reguliertes Cofilin kann die Migration steigern. Cofilin wird durch die pLIMK1 inaktiviert [54]. In der vorliegenden Arbeit wird Cofilin in HT1080 CD97(EGF1,2,5) stärker exprimiert und weniger an Ser³ phosphoryliert, d.h., CD97 aktiviert Cofilin. Die durch CD97 erhöhte Expression der LIMK1 weist auf eine stärkere Interaktion von LIMK1 und Cofilin in HT1080 hin.

ROCK und MLCK sind Kinasen, die die Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten 2 (MLC2) und dadurch den Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionskontakten und von Membranprotrusionen steuern. Sie sind damit für die Migration von Zellen wichtig [122]. Die CD97-induzierte Migrationssteigerung im Wundverschlussversuch wird durch spezifische

Inhibierung von ROCK zusätzlich beschleunigt, während die spezifische Inhibierung von MLCK diese hemmt.

5. **CD97 steigert Kinaseaktivität von GSK3**

GSK3 reguliert verschiedenste zelluläre Prozesse. GSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und GSK3 beta Tyr²¹⁶ sind Autophosphorylierungen, die die Kinaseaktivität und Proteinstabilität erhöhen. CD97 steigert pGSK3 alpha Tyr²⁷⁹ und pGSK3 beta Tyr²¹⁶ und dadurch die Kinaseaktivität in HT1080.

6. **CD97 reguliert den Erk-Signalweg**

Die Aktivierung des Erk-Signalweges kann Apoptose induzieren [84]. CD97 steigert pRaf1 Ser²⁵⁹ und inhibiert dadurch Raf1, das regulatorische Mitglied des Erk-Signalweges. Die folgenden Mitglieder des Erk-Signalweges sind aber stärker aktiviert. Die CD97-induzierte Regulation und die damit verbundene Funktion des Erk-Signalweges in HT1080 bleiben bisher unklar.

7. **CD97 reguliert Proteine, die Proliferation, Apoptosekaskade und Zellzyklus kontrollieren**

Insgesamt haben wir mehrere Signalwege identifiziert, die durch eine Überexpression von CD97 in HT1080 reguliert werden. Die stabilen Klone zeigen in Abhängigkeit vom exprimierten CD97 Unterschiede in der 2D-Einzelzellmigration und im Wundverschlussversuch, die sich auf Unterschiede in der Signaltransduktion zurückführen lassen.

Literaturverzeichnis

- [1] Schioth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 2005;142(1-2):94–101.
- [2] Langenhan T, Aust G, Hamann J. Sticky signaling--adhesion class G protein-coupled receptors take the stage. *Sci Signal* 2013;6(276):re3.
- [3] Lin H, Chang G, Davies JQ, Stacey M, Harris J, Gordon S. Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif. *J Biol Chem* 2004;279(30):31823–32.
- [4] Hsiao C, Chen H, Chang G, Lin H. GPS autoproteolysis is required for CD97 to up-regulate the expression of N-cadherin that promotes homotypic cell-cell aggregation. *FEBS Lett* 2011;585(2):313–8.
- [5] Ward Y, Lake R, Yin JJ, Heger CD, Raffeld M, Goldsmith PK et al. LPA receptor heterodimerizes with CD97 to amplify LPA-initiated RHO-dependent signaling and invasion in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(23):7301–11.
- [6] Eichler W, Aust G, Hamann D. Characterization of an early activation-dependent antigen on lymphocytes defined by the monoclonal antibody BL-Ac(F2). *Scand J Immunol* 1994;39(1):111–5.
- [7] Hamann J, Eichler W, Hamann D, Kerstens HM, Poddighe PJ, Hoovers JM et al. Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain. *J Immunol* 1995;155(4):1942–50.
- [8] Chang G, Stacey M, Kwakkenbos MJ, Hamann J, Gordon S, Lin H. Proteolytic cleavage of the EMR2 receptor requires both the extracellular stalk and the GPS motif. *FEBS Lett* 2003;547(1-3):145–50.
- [9] Gray JX, Haino M, Roth MJ, Maguire JE, Jensen PN, Yarme A et al. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol* 1996;157(12):5438–47.
- [10] Eichler W. CD97 isoform expression in leukocytes. *J Leukoc Biol* 2000;68(4):561–7.
- [11] Galle J, Sittig D, Hanisch I, Wobus M, Wandel E, Loeffler M et al. Individual cell-based models of tumor-environment interactions: Multiple effects of CD97 on tumor invasion. *Am J Pathol* 2006;169(5):1802–11.
- [12] Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 1996;184(3):1185–9.
- [13] Stacey M, Chang G, Davies JQ, Kwakkenbos MJ, Sanderson RD, Hamann J et al. The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood* 2003;102(8):2916–24.
- [14] Wang T, Ward Y, Tian L, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG et al. CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood* 2005;105(7):2836–44.

- [15] Wandel E, Saalbach A, Sittig D, Gebhardt C, Aust G. Thy-1 (CD90) is an interacting partner for CD97 on activated endothelial cells. *J Immunol* 2012;188(3):1442–50.
- [16] Wobus M, Vogel B, Schmucking E, Hamann J, Aust G. N-glycosylation of CD97 within the EGF domains is crucial for epitope accessibility in normal and malignant cells as well as CD55 ligand binding. *Int J Cancer* 2004;112(5):815–22.
- [17] Jaspars LH, Vos W, Aust G, van Lier RA, Hamann J. Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor. *Tissue Antigens* 2001;57(4):325–31.
- [18] Aust G, Wandel E, Boltze C, Sittig D, Schutz A, Horn L et al. Diversity of CD97 in smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 2006;324(1):139–47.
- [19] Aust G, Eichler W, Laue S, Lehmann I, Heldin NE, Lotz O et al. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas. *Cancer Res* 1997;57(9):1798–806.
- [20] Mustafa T, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Schmutzler C, Koehrle J et al. Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Oncol* 2004;24(2):285–94.
- [21] Steinert M, Wobus M, Boltze C, Schutz A, Wahlbuhl M, Hamann J et al. Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues. *Am J Pathol* 2002;161(5):1657–67.
- [22] Han S, Xu C, Wu X, Li J, Liu Z, Zeng Q. The impact of expressions of CD97 and its ligand CD55 at the invasion front on prognosis of rectal adenocarcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2010;25(6):695–702.
- [23] Aust G, Steinert M, Schutz A, Boltze C, Wahlbuhl M, Hamann J et al. CD97, but not its closely related EGF-TM7 family member EMR2, is expressed on gastric, pancreatic, and esophageal carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2002;118(5):699–707.
- [24] Liu D, Trojanowicz B, Ye L, Li C, Zhang L, Li X et al. The invasion and metastasis promotion role of CD97 small isoform in gastric carcinoma. *PLoS One* 2012;7(6):e39989.
- [25] Ward Y, Lake R, Martin PL, Killian K, Salerno P, Wang T et al. CD97 amplifies LPA receptor signaling and promotes thyroid cancer progression in a mouse model. *Oncogene* 2012.
- [26] Li L, Spendlove I, Morgan J, Durrant LG. CD55 is over-expressed in the tumour environment. *Br J Cancer* 2001;84(1):80–6.
- [27] Aust G. 9 Immunohistochemical detection of CD97 protein in colorectal carcinoma. In: *Molecular Pathology, Colorectal Carcinoma, and Prostate Carcinoma*: Elsevier; 2002, p. 201–206.
- [28] Becker S, Wandel E, Wobus M, Schneider R, Amasheh S, Sittig D et al. Overexpression of CD97 in intestinal epithelial cells of transgenic mice attenuates colitis by strengthening adherens junctions. *PLoS One* 2010;5(1):e8507.
- [29] Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 1974;33(4):1027–33.
- [30] Gupta S, Plattner R, Der CJ, Stanbridge EJ. Dissection of Ras-dependent signaling pathways controlling aggressive tumor growth of human fibrosarcoma cells: evidence for a potential novel pathway. *Mol Cell Biol* 2000;20(24):9294–306.

- [31] Niggli V, Schmid M, Nievergelt A. Differential roles of Rho-kinase and myosin light chain kinase in regulating shape, adhesion, and migration of HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(2):602–8.
- [32] Gupta S, Stuffrein S, Plattner R, Tencati M, Gray C, Whang YE et al. Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol* 2001;21(17):5846–56.
- [33] Keller HU, Hunziker IP, Sordat B, Niggli V, Sroka J. Protein kinase C isoforms involved in regulation of cell shape and locomotion of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Int J Cancer* 2000;88(2):195–203.
- [34] Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 2000;25(12):596–601.
- [35] Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 2005;30(6):286–90.
- [36] Binau F, Pawlak G, Roux P, Hibner U. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst* 2010;6(4):648–61.
- [37] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):362–74.
- [38] Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, Andrian UH von, Deryugina EI et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160(2):267–77.
- [39] Green JA, Stockton RA, Johnson C, Jacobson BS. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase regulate wound closure in NIH/3T3 fibroblast monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C373-83.
- [40] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55–63.
- [41] Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997;13:261–91.
- [42] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19(1):107–20.
- [43] KPSS phosphosite Profiling Services.
http://www.kinexus.ca/ourServices/immunoblotting/phosphosite_profiling/phosphosite_profiling.html. Accessed 2 September 2014.
- [44] Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003;34(2):374–8.
- [45] Opgen-Rhein R, Strimmer K. Accurate ranking of differentially expressed genes by a distribution-free shrinkage approach. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2007;6:Article9.
- [46] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society; Series B* 1995:289–300.

- [47] Victor A, Elsasser A, Hommel G, Blettner M. Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing--part 10 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(4):50–6.
- [48] Dickinson RB, Tranquillo RT. Optimal estimation of cell movement indices from the statistical analysis of cell tracking data. *AIChE J.* 1993;39(12):1995–2010.
- [49] Small JV, Geiger B, Kaverina I, Bershadsky A. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(12):957–64.
- [50] Kim D, Dan HC, Park S, Yang L, Liu Q, Kaneko S et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front Biosci* 2005;10:975–87.
- [51] Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289–305.
- [52] Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007;213(3):589–602.
- [53] Elia A, Constantinou C, Clemens MJ. Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. *Oncogene* 2008;27(6):811–22.
- [54] Nishita M, Tomizawa C, Yamamoto M, Horita Y, Ohashi K, Mizuno K. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol* 2005;171(2):349–59.
- [55] Matheny RW Jr, Adamo ML. Current perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234(11):1264–70.
- [56] Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009;21(4):470–6.
- [57] Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* 2001;15(11):1953–62.
- [58] Kim W, Lee M, Kim J, Suk K, Lee W. Decursinol angelate blocks transmigration and inflammatory activation of cancer cells through inhibition of PI3K, ERK and NF-kappaB activation. *Cancer Lett* 2010;296(1):35–42.
- [59] Vanhaesebroeck B, Alessi. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:561–76.
- [60] Park S, Kim D, Kaneko S, Szewczyk KM, Nicosia SV, Yu H et al. Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *J Biol Chem* 2005;280(47):38932–41.
- [61] Debidda M, Wang L, Zang H, Poli V, Zheng Y. A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 2005;280(17):17275–85.
- [62] Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 2007;32(4-5):577–95.
- [63] Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* 2004;377(Pt 1):249–55.
- [64] Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010;223(1):14–26.

- [65] Pyper JM, Bolen JB. Identification of a novel neuronal C-SRC exon expressed in human brain. *Mol. Cell. Biol.* 1990;10(5):2035–40.
- [66] proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src [Homo sapiens] - Protein - NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005408.1. Accessed 2 September 2014.
- [67] proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src [Homo sapiens] - Protein - NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_938033.1. Accessed 2 September 2014.
- [68] Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src - SRC - Homo sapiens (Human). <http://www.uniprot.org/uniprot/P12931>. Accessed 2 September 2014.
- [69] Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, Sawyer TK, Brunton VG et al. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 2006;25(42):5726–40.
- [70] Ahn J, Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 7):1814–26.
- [71] Pera IL, Iuliano R, Florio T, Susini C, Trapasso F, Santoro M et al. The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* 2005;24(19):3187–95.
- [72] Wu L, Bernard-Trifilo JA, Lim Y, Lim ST, Mitra SK, Uryu S et al. Distinct FAK-Src activation events promote alpha5beta1 and alpha4beta1 integrin-stimulated neuroblastoma cell motility. *Oncogene* 2008;27(10):1439–48.
- [73] Tureckova J, Vojtechova M, Krausova M, Sloncova E, Korinek V. Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. *Transl Oncol* 2009;2(4):281–90.
- [74] Zhang H, Wang Y, Xing F, Wang J, Wang Y, Wang H et al. Overexpression of LIMK1 promotes migration ability of multidrug-resistant osteosarcoma cells. *Oncol Res* 2011;19(10-11):501–9.
- [75] Mishima T, Naotsuka M, Horita Y, Sato M, Ohashi K, Mizuno K. LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392(4):577–81.
- [76] Chen CL, Hsieh YT, Chen HC. Phosphorylation of adducin by protein kinase Cdelta promotes cell motility. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 7):1157–67.
- [77] Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa T, Srinivasula S et al. PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC-delta phosphorylation and cell migration downstream of Galpha12. *Nat Cell Biol* 2012;14(7):686–96.
- [78] Liu Y, Belkina NV, Graham C, Shaw S. Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *J Biol Chem* 2006;281(17):12102–11.
- [79] Matsuoka Y, Li X, Bennett V. Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(6):884–95.
- [80] Naydenov NG, Ivanov AI. Adducins regulate remodeling of apical junctions in human epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2010;21(20):3506–17.

- [81] Akai J, Storey K. Expression of gamma-adducin is associated with regions of morphogenetic cell movement in the chick embryo. *Mech Dev* 2002;119 Suppl 1:S191-5.
- [82] Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase Calpha. *Curr Biol* 1996;6(9):1114-23.
- [83] Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. Mechanism of inhibition of sequestration of protein kinase C alpha/betall by ceramide. Roles of ceramide-activated protein phosphatases and phosphorylation/dephosphorylation of protein kinase C alpha/betall on threonine 638/641. *J Biol Chem* 2007;282(28):20647-56.
- [84] Chiu HW, Lin JH, Chen YA, Ho SY, Wang YJ. Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances cell-killing effects in human fibrosarcoma cells in vitro and in vivo through induction of both autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2010;6(3):353-65.
- [85] RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase - RAF1 - Homo sapiens (Human). <http://www.uniprot.org/uniprot/P04049>. Accessed 4 September 2014.
- [86] Butch ER, Guan KL. Characterization of ERK1 activation site mutants and the effect on recognition by MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 1996;271(8):4230-5.
- [87] Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995;267(5198):682-5.
- [88] Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996;16(3):1247-55.
- [89] McCoy CE, Campbell DG, Deak M, Bloomberg GB, Arthur JS. MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J* 2005;387(Pt 2):507-17.
- [90] Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 1998;17(15):4426-41.
- [91] Kato S, Ding J, Du K. Differential activation of CREB by Akt1 and Akt2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(4):1061-6.
- [92] Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998;273(49):32377-9.
- [93] Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70(4):1032-60.
- [94] Kinexus | PhosphoNET. <http://www.phosphonet.ca/>. Accessed 9 September 2014.
- [95] Zhang F, Romano PR, Nagamura-Inoue T, Tian B, Dever TE, Mathews MB et al. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J Biol Chem* 2001;276(27):24946-58.
- [96] Takada Y, Ichikawa H, Pataer A, Swisher S, Aggarwal BB. Genetic deletion of PKR abrogates TNF-induced activation of Ikbα kinase, JNK, Akt and cell proliferation but potentiates p44/p42 MAPK and p38 MAPK activation. *Oncogene* 2006;26(8):1201-12.

- [97] Waetzig V, Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(9):455–61.
- [98] Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994;76(6):1025–37.
- [99] Hennigan RF, Stambrook PJ. Dominant negative c-jun inhibits activation of the cyclin D1 and cyclin E kinase complexes. *Mol Biol Cell* 2001;12(8):2352–63.
- [100] Leppa S, Bohmann D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 1999;18(45):6158–62.
- [101] Yang Q, Guan K. Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 2007;17(8):666–81.
- [102] Memmott R, Dennis P. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 2009;21(5):656–64.
- [103] Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 1999;13(11):1422–37.
- [104] Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 1997;410(1):78–82.
- [105] Kim D, Akcakanat A, Singh G, Sharma C, Meric-Bernstam F. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. *Growth Factors* 2009;27(1):12–21.
- [106] Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C281-91.
- [107] Zarkowska T, Mitnacht S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1997;272(19):12738–46.
- [108] Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K et al. The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J* 1996;15(24):7060–9.
- [109] Driscoll B, T'Ang A, Hu YH, Yan CL, Fu Y, Luo Y et al. Discovery of a regulatory motif that controls the exposure of specific upstream cyclin-dependent kinase sites that determine both conformation and growth suppressing activity of pRb. *J Biol Chem* 1999;274(14):9463–71.
- [110] Lee SB, Xuan Nguyen TL, Choi JW, Lee KH, Cho SW, Liu Z et al. Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(43):16584–9.
- [111] Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2004;279(34):35726–34.
- [112] Lew DJ, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996;8(6):795–804.
- [113] Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374(6518):131–4.
- [114] Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 1999;25(1):91–3.

- [115] Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 24):4359–69.
- [116] Kramer RH, Bensch KG, Wong J. Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res* 1986;46(4 Pt 2):1980–9.
- [117] Dunn EF, Fearn R, Connor JH. Akt inhibitor Akt-IV blocks virus replication through an Akt-independent mechanism. *J Virol* 2009;83(22):11665–72.
- [118] Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Kazuki Y, Takashima S, Oshimura M et al. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):76–86.
- [119] Zhou G, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field J. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J Biol Chem* 2006;281(47):36443–53.
- [120] Cardenas ME, Sanfridson A, Cutler NS, Heitman J. Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *Trends Biotechnol* 1998;16(10):427–33.
- [121] Blake RA, Broome MA, Liu X, Wu J, Gishizky M, Sun L et al. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(23):9018–27.
- [122] Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* 2004;164(3):427–39.
- [123] Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351(Pt 1):95–105.
- [124] Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 2003;371(Pt 1):199–204.
- [125] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(9):a011189.

Anlage 1

Schematische Darstellung der Adhäsions-GPCR

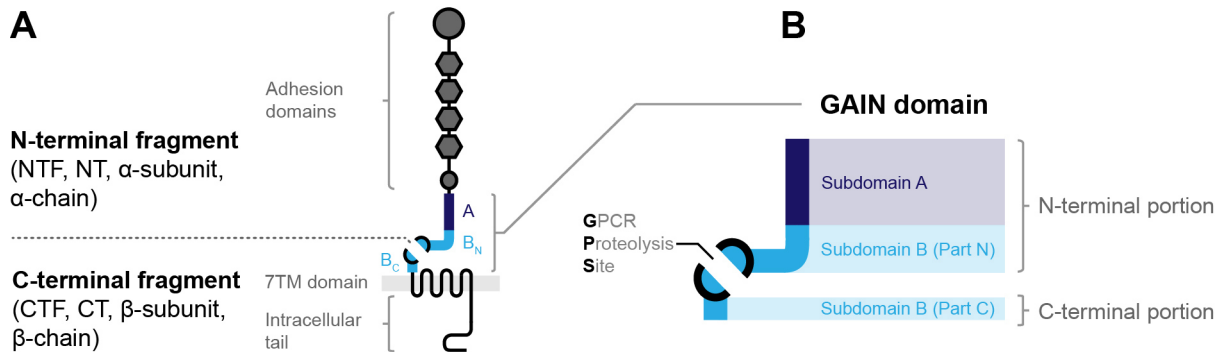


Abb. A.1 Schematische Darstellung der Adhäsions-GPCR aus Langenhan et al. [2]

Anlage 2

E-Mail Korrespondenz zur Klärung von Fragen bzgl. des Kinetworks Phosphosite Screen KPSS 1.3 Profiling (Multi-Immunoblot™)

In den übermittelten Originaldaten zur Order 2141 vom 14.10.2009 wird p85 ribosomal protein-serine S6 kinase 2 Thr⁴¹² mit der Bezeichnung p85 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha Thr³⁸⁹ geführt. Diese Diskrepanz in der Bezeichnungsweise wurde durch Frau Catherine Sutter, Kinexus Bioinformatics Corporation, aufgeklärt. Dazu hier die Korrespondenz:

Dear Susann,

Thank you for your email message. I can assist with your question. The S6Ka [T389] site and [T412] site are the same. We have found a great deal of discrepancy with the naming of different phosphorylation sites (which could be based on using different isoforms of the protein or from different species), so we have tried to name all of our sites based on the human full length protein whenever possible.

Best regards,

Catherine Sutter
Kinexus Bioinformatics Corporation
T: 604.323.2547, Ext 11
F: 604.323.2548

From: Catherine Sutter [<mailto:csutter@kinexus.ca>]
Sent: Wednesday, February 26, 2014 12:20 PM

To: 'Brosig, Susann'

Subject: Support request, #2141

Weiterhin Klärung der Frage, zur Bedeutung der Molekulargewichtsangabe in den Originaldaten:

Dear Susann,

The numbers in brackets refer to molecular weights assigned by Kinexus as evidenced on our gels based on our molecular weight marker sets.

These numbers may not correspond to the length of the protein in UniProtKD as they are internally assigned.

Src: 2 isoforms produced by alternative splicing. Please refer to UniProtKB P12931 (SRC_HUMAN) for further information.

Raf1: 2 isoforms produced by alternative splicing. Please refer to UniProtKB P04049 (RAF1_HUMAN) for further information.

MsK1: The antibody datasheet indicates that this antibody may cross react with MSK2, which is indicated by the (66). The (74) refers to MSK1.

Please refer to UniprotKD O75582 (KS6A5_HUMAN) for further information for MSK1.

Please refer to UniprotKD O75676 (KS6A4_HUMAN) for further information for MSK2.

Jun (c-Jun,P05412): The antibody data sheet indicates that this antibody also may detect Jun-D. Please refer to UniprotKD P17535 (JUND_HUMAN).

The other two bands are cross reactions with other Jun family members.

You can compare the same band across all samples, or sum all the intensities for each protein; it depends on how you would like to compare your data.

Please let me know if you have any further question.

Best regards,

Litsa Blanis

Von: lblanis@kinexus.ca [lblanis@kinexus.ca]

Gesendet: Montag, 18. April 2011 23:10

An: Brosig, Susann

Betreff: Re: Support request, #2141

Anlage 3

Kinetworks Antibody Panel

KINETWORKS™ PHOSPHO-SITE BROAD COVERAGE PATHWAY SCREEN

Catalog Number - KPSS 1.3

Protein, Abkürzung und detektiertes Epitop, Screen vom 14.10.2009

Adducin alpha (ADD1) [S726]	Adducin a	S726
Adducin gamma (ADD3) [S693]	Adducin g	S693
B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38) [S4]	B23 (NPM)	S4
cAMP response element binding protein 1 [S133]	CREB1	S133
Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2 [Y15] (24)	CDK1/2	Y15
Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2 [Y15] (27)	CDK1/2	Y15
Double-stranded RNA-dependent protein-serine kinase [T451] (65)	PKR1	T451
Double-stranded RNA-dependent protein-serine kinase [T451] (73)	PKR1	T451
Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase) [T202+Y204]	Erk1	T202+Y204
Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase) [T185+Y187]	Erk2	T185+Y187
Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha [S21]	GSK3a	S21
Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha [Y279] (44)	GSK3a	Y279
Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha [Y279] (49)	GSK3a	Y279
Glycogen synthase-serine kinase 3 beta [S9]	GSK3b	S9
Glycogen synthase-serine kinase 3 beta [Y216] (34)	GSK3b	Y216
Glycogen synthase-serine kinase 3 beta [Y216] (39)	GSK3b	Y216
Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK)) [T183+Y185]	JNK	T183+Y185

(37)		
Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK)) [T183+Y185] (38)	JNK	T183+Y185
Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK)) [T183+Y185] (44)	JNK	T183+Y185
Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK)) [T183+Y185] (46)	JNK	T183+Y185
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor [S73] (37)	Jun	S73
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor [S73] (39)	Jun	S73
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor [S73] (41)	Jun	S73
Jun proto-oncogene-encoded AP1 transcription factor [S73] (43)	Jun	S73
MAPK/ERK protein-serine kinase 1/2 (MKK1/2) [S218+S222]	MEK1/2 (MAP2K1/2)	S218+S222
MAPK/ERK protein-serine kinase 3/6 (MKK3/6) [S189/S207]	MEK3/6 (MAP2K3/6)	S189/S207
Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1 [S376] (66)	Msk1	S376
Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1 [S376] (74)	Msk1	S376
Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha [T180+Y182] (36)	p38a MAPK	T180+Y182
Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha [T180+Y182] (40)	p38a MAPK	T180+Y182
N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor 1 subunit zeta [S896]	NR1	S896
p70 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha [T389]	S6Ka (p70 S6Ka)	T389
p85 ribosomal protein-serine S6 kinase alpha [T389]	S6Ka (p85 S6Ka)	T389
Protein-serine kinase B alpha [S473]	PKBa (Akt1)	S473

Protein-serine kinase B alpha [T308]	PKBa (Akt1)	T308
Protein-serine kinase C alpha [S657]	PKCa	S657
Protein-serine kinase C alpha/beta 2 [T638/T641]	PKCa/b2	T638/T641
Protein-serine kinase C delta [T507]	PKCd	T507
Protein-serine kinase C epsilon [S729]	PKCe	S729
Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase [S259] (60)	Raf1	S259
Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase [S259] (63)	Raf1	S259
Retinoblastoma-associated protein 1 [S780]	Rb	S780
Retinoblastoma-associated protein 1 [S807+S811]	Rb	S807+S811
Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/3 [T359+S363/T356+S360] (79)	RSK1/3	T359+S363/T356+S360
Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/3 [T359+S363/T356+S360] (87)	RSK1/3	T359+S363/T356+S360
Signal transducer and activator of transcription 1 [Y701] (78)	STAT1	Y701
Signal transducer and activator of transcription 1 [Y701] (87)	STAT1	Y701
Signal transducer and activator of transcription 3 [S727]	STAT3	S727
Signal transducer and activator of transcription 5A [Y694]	STAT5A	Y694
SMA- and mothers against decapentaplegic homologs 1/5/9 [S463+S465/S463+S465/S465+S467]	Smad1/5/9	S463+S465/S463+S465/S465+S467
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase [Y418] (44)	Src	Y418
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase [Y418] (46)	Src	Y418
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase [Y529] (44)	Src	Y529
Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase [Y529] (46)	Src	Y529

Tab. 1 Übersicht zu den im Multi-Immunoblot™ von Kinexus untersuchten Proteinphosphorylierungen

Anlage 4

Schematische Übersichten zu den wichtigsten der untersuchten Signalwege. Es soll die Interaktion der Signalwegmitglieder untereinander veranschaulicht werden, welche die Wechselwirkung in vivo widerspiegeln.

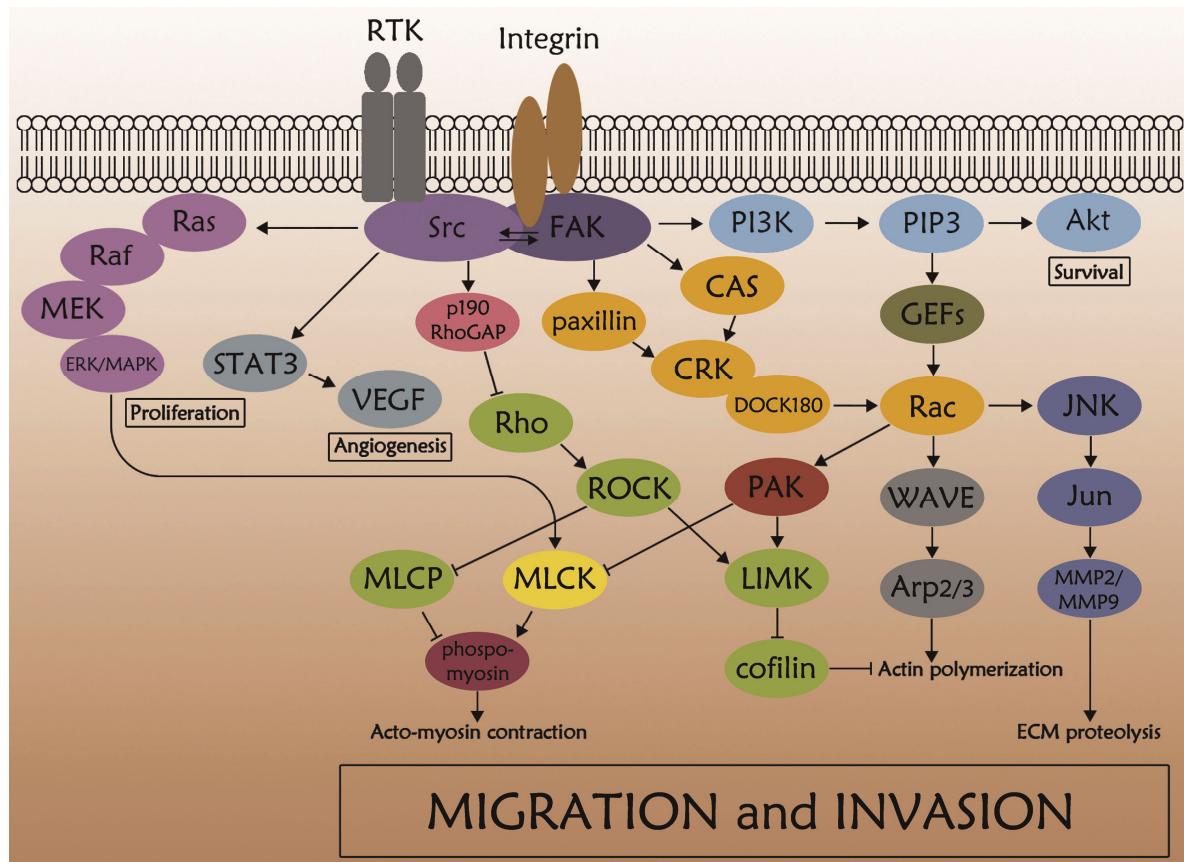


Abb. A.2 Src Signalweg aus Guarino et al. [64]

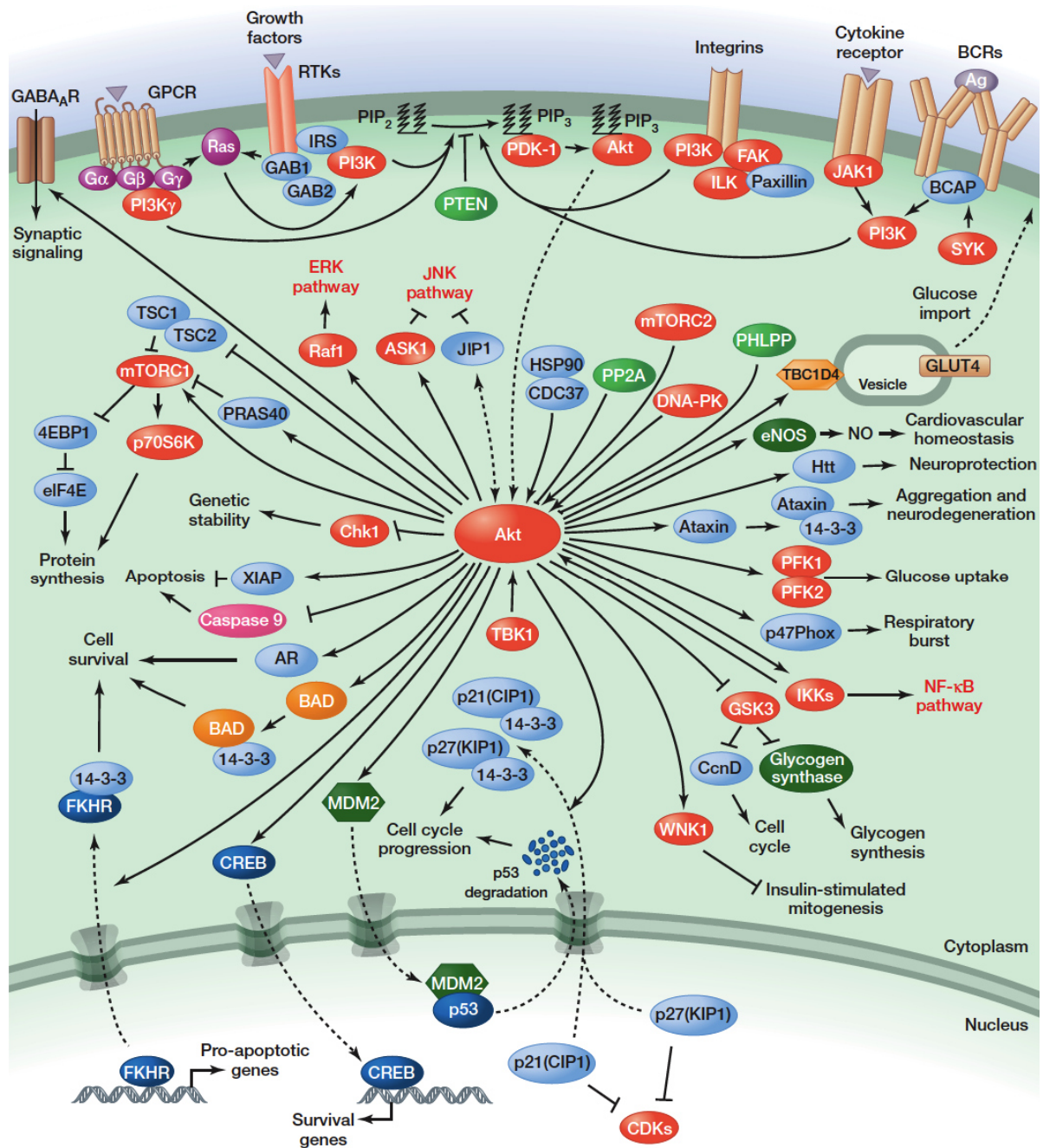


Abb. A.3 PI3-Kinase/Akt-Signalweg aus Hemmings et al. [125]



Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Publikation

Posterpräsentationen mit Veröffentlichung im Abstract-Band

Brosig S., Sittig D., Aust G., Wandel E., (2008), *CD97 overexpression enhanced migration through activation of PI3K/Akt-pathway*, 7th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2008, Abstract Book

Brosig S., Wandel E., Keyßelt K., Sittig D., Aust G. (2010), *The PIK3/Akt pathway is involved in CD97 enhanced single random cell migration and decreased apoptosis induced by serum-starvation in HT1080 tumor cells*, 9th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2010, Abstract Book

Brosig S., Sittig D., Galle J. (2012), *CD97 increases single random tumor cell migration*, 11th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2012, Abstract Book

Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Aust für die Ermöglichung der Arbeit, die langjährige Unterstützung und Geduld bei Konzeption und Durchführung der Versuche und für die wichtigen sachlichen Hinweise. Weiterhin danken möchte ich den anderen Mitgliedern des Forschungslabors Chirurgie, insbesondere Frau Dr. Wandel und Frau Sittig, denen ich meine Kenntnisse und Fähigkeiten beim wissenschaftlichen Arbeiten verdanke und die jederzeit mit Rat und Tat die Entstehung der Arbeit begleitet haben. Vielen Dank an Frau Dr. Brylla, die mein Interesse für die Forschung entdeckt und den Kontakt zur Arbeitsgruppe von Frau Prof. Aust erst ermöglicht hat. Großer Dank gilt Herrn Dr. Galle vom Interdisziplinären Zentrum für Bioinformatik, der mir das Excel-„Makro“ zur Auswertung der 2D-Einzelzell-Migration überlassen hat. Ebenso danken möchte ich auch Herrn Bernd Klaus vom Institut für Medizinische Statistik für die Unterstützung bei der statistischen Signifikanzprüfung der Western Blot Ergebnisse mittels Statistikprogramm „R“. Dank aussprechen möchte ich meiner Familie, die mit viel Geduld die Vollendung dieser Arbeit begleitet hat.